

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Irena Vopálenská

**DIFERENCIACE KOLONIÍ KVASINEK A VÝVOJ NOVÝCH PŘÍSTUPŮ PRO  
MONITOROVÁNÍ DOSTUPNOSTI KYSLÍKU A PŘÍTOMNOSTI ŽIVIN**

DIFFERENTIATION OF YEAST COLONIES AND DEVELOPMENT OF NEW  
APPROACHES TO MONITOR OXYGEN AND NUTRIENT AVAILABILITY

Dizertační práce

Školitelka: doc. RNDr. Blanka Janderová, CSc.

Konzultantka: prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Praha 2015



Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 23. 5. 2015





Tato práce byla vypracována za podpory následujících grantů: TAČR TA01011461, GAČR 15-08225S, 13-08605S, SVV-2015-260209.

Práce byla dále podpořena v rámci projektu „BIOCEV - Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy“ (CZ.1.05/1.1.00/02.0109), z Evropského fondu pro regionální rozvoj.

Na tomto místě bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Blance Janderové, CSc. a prof. RNDr. Zdeně Palkové, CSc. za možnost podílet se na řešení zajímavé problematiky. Všem členům našich laboratoří děkuji za rozmanitou pomoc a podporu a hlavně za vytvoření příjemného bezkonfliktního pracovního prostředí. Zvláštní poděkování patří mé rodině.

# Obsah

<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>15</b>
<b>2 CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>17</b>
<b>3 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>18</b>
3.1 FILAMENTÁRNÍ RŮST U KVASINKY <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	21
3.1.1 <i>Vnější faktory navozující tvorbu pseudohyf</i> .....	22
3.1.1.1 Dusíkové hladovění jako příčina tvorby pseudohyf .....	22
3.1.1.2 Invazivní růst.....	22
3.1.1.3 Glukózové hladovění jako příčina filamentárního růstu .....	23
3.1.1.4 <i>Fusel</i> alkoholy stimulují filamentární růst.....	23
3.1.1.5 Alkoholy s krátkým uhlíkatým řetězcem .....	23
3.1.1.6 Aromatické alkoholy - <i>Quorum sensing</i> .....	24
3.1.2 <i>Kvasinkové a pseudohyfální buňky jsou odlišné buněčné typy</i> .....	25
3.1.2.1 Tvar pseudohyfálních buněk.....	25
3.1.2.2 Typ pučení .....	26
3.1.2.3 Průběh buněčného cyklu .....	27
3.1.3 <i>Flokuliny</i> .....	28
3.1.3.1 Flokulin Flo11p .....	30
3.1.4 <i>Metabolické dráhy a geny podílející se na regulaci filamentárního růstu</i> .....	30
3.1.4.1 RAS/PKA signální dráha .....	30
3.1.4.2 YAK1 dráha .....	33
3.1.4.3 Dráha SNF1 - dráha glukózové represe.....	33
3.1.4.4 TOR dráha .....	35
3.1.4.5 Mep2p .....	36
3.1.4.6 Signální dráha RIM101.....	36
3.1.4.7 MAPK signální dráhy .....	38
3.1.4.8 Transkripční faktory Mss11p a Flo8p .....	40
3.1.4.9 Transkripční faktor Rme1p .....	40
3.1.4.10 Transkripční faktor Opi1p .....	40
3.1.4.11 SPS systém .....	41
3.1.4.12 Vitamín B9 .....	41
3.1.4.13 Mitochondriální geny .....	41
3.1.5 <i>Regulace exprese FLO11</i> .....	42
3.1.6 <i>Regulace polarizovaného růstu a buněčného cyklu</i> .....	45
3.1.7 <i>Biofilmy a „maty“</i> .....	47
3.1.8 <i>Závěr</i> .....	49
<b>4 MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>52</b>
4.1 MATERIÁL .....	52
4.1.1 <i>Použité mikroorganismy</i> .....	52
4.1.2 <i>Použité plazmidy</i> .....	53
4.1.3 <i>Použité primery</i> .....	54
4.1.4 <i>Přístroje</i> .....	55
4.1.5 <i>Roztoky</i> .....	55
4.1.5.1 Jednoduché roztoky.....	55
4.1.5.2 Složené roztoky .....	56
4.1.6 <i>Kultivační média</i> .....	57
4.1.6.1 Pevná média .....	57
4.1.6.2 Tekutá média .....	58
4.1.6.3 Antibiotika, auxotrofní přídavky, pH indikátor .....	59
4.1.7 <i>Materiál pro práci s DNA</i> .....	59
4.1.8 <i>Ostatní</i> .....	59
4.2 METODY .....	60
4.2.1 <i>Sterilizace</i> .....	60
4.2.2 <i>Kultivace mikroorganismů</i> .....	60
4.2.2.1 Kultivace v tekutém médiu .....	60

4.2.2.2 Kultivace na pevném médiu .....	60
4.2.3 Skladování mikroorganismů .....	61
4.2.4 Stanovení počtu buněk a optické denzity kultury .....	61
4.2.5 Křížení kvasinek .....	61
4.2.6 Sporulace .....	61
4.2.7 Mikromanipulace .....	61
4.2.8 Stanovení typu pučení .....	62
4.2.9 Barvení invazivně rostoucích kolonií .....	62
4.2.10 Test adhezivity buněk .....	62
4.2.11 Příprava tenkých řezů z obřích kolonií .....	62
4.2.12 Příprava alginátových kuliček .....	62
4.2.13 Světelná a fluorescenční mikroskopie .....	63
4.2.14 Fotografování kvasinkových kolonií a buněk .....	63
4.2.15 Indukce kolonií plynými aminy .....	63
4.2.16 Přerušení genu <i>BUD2</i> .....	63
4.2.17 Delece genu <i>ADE2</i> a <i>ADE1</i> .....	64
4.2.18 Vložení promotorů <i>CUP1</i> a <i>GAL1</i> .....	64
4.2.19 Další použité metody .....	64
4.2.20 Seznam dalších osvojených metod .....	64
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>65</b>
5.1 VLIV TYPU PUČENÍ A BUNĚČNÉ ADHEZE NA MORFOLOGII KOLONIÍ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	65
5.1.1 Morfologie obřích kolonií a monokolonií .....	66
5.1.2 Příprava nových kmenů .....	68
5.1.3 Pučení v tekutém médiu .....	68
5.1.4 Vliv typu pučení na morfologii kvasinkových kolonií .....	70
5.1.5 Vliv hustoty výsevu na morfologii monokolonií .....	72
5.1.6 Vliv agregace buněk na morfologii kolonií .....	72
5.1.7 Diskuze .....	74
5.2 ROLE DVOU ODLIŠNÝCH DIMORFNÍCH PŘEMĚN PŘI VÝVOJI KOLONIÍ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	76
5.2.1 Přepnutí na monopolární růst je ovlivněno hustotou monokolonií .....	76
5.2.2 První dimorfní přeměna je indukována amoniakem a vede k orientovanému růstu sousedních monokolonií .....	78
5.2.3 Druhá dimorfní přeměna časově odpovídá začátku vývoje „vrásčité“ morfologie monokolonií a obřích kolonií .....	80
5.2.4 Úloha flokulinu <i>Flo11</i> při druhé dimorfní přeměně a při vývoji „vrásčité“ morfologie .....	81
5.2.5 Diskuze .....	84
5.3 VLIV METYLAMINU NA VÝVOJ KOLONIÍ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	86
5.3.1 Metylamin vyvolává předčasnou alkalickou fázi .....	86
5.3.2 PŮSOBNÍ METYLAMINU OVLIVŇUJE MORFOLOGII KVASINKOVÉ KOLONIE .....	87
5.3.3 VLIV AMONIAKU NA MORFOLOGII KVASINKOVÉ KOLONIE .....	92
5.3.4 PŮSOBNÍ METYLAMINU INDUKUJE EXPRESI GENU <i>ATO1</i> -GFP .....	93
5.3.5 DISKUZE .....	97
5.4 POUŽITÍ KMENŮ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> S MUTACÍ <i>ADE2</i> PRO DETEKCI PŘÍTOMNOSTI ŽIVIN .....	99
5.4.1 Příprava detekčních kmenů .....	99
5.4.2 Monitorování přítomnosti kyslíku a živin uvnitř kvasinkových kolonií .....	102
5.4.2.1 Detekce dostupnosti kyslíku a adeninu v obřích koloniích .....	102
5.4.2.2 Detekce galaktózy .....	104
5.4.2.3 Diskuze .....	105
5.4.3 Detekce mědi ve vnějším prostředí .....	107
5.4.3.1 Výběr vhodného způsobu kultivace a kultivačního média .....	107
5.4.3.2 Detekce měďnatých iontů v tekuté kultuře <i>S. cerevisiae</i> BSCu .....	107
5.4.3.3 Detekce měďnatých iontů - imobilizované kvasinky <i>S. cerevisiae</i> BSCu .....	108
5.4.3.4 Detekce měďnatých iontů - statická kultivace imobilizovaného kmene <i>S. cerevisiae</i> BSCu .....	109
5.4.3.5 Návod pro detekci $\text{Cu}^{2+}$ iontů pomocí imobilizovaného kmene BSCu .....	110
5.4.3.6 Diskuze .....	112
<b>6 ZÁVĚR .....</b>	<b>116</b>

<b>7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>117</b>
<b>8 PŘÍLOHA - PUBLIKACE .....</b>	<b>130</b>

## Seznam zkratek

AAS	atomová absorpční spektrometrie ( <u>a</u> tomic <u>a</u> bsorption <u>s</u> pectroscopy)
Ac	acetát
AMP	adenosin monofosfát ( <u>a</u> denosine <u>m</u> onophosphate)
ATP	adenosin trifosfát ( <u>a</u> denosine <u>t</u> riphosphate)
BKP	bromkresolový purpur, pH indikátor s barevným přechodem 5,2 (žlutá) - 6,8 (fialová); barví poškozené a mrtvé buňky
cAMP	cyklický adenosin monofosfát ( <u>c</u> yclic <u>a</u> denosine <u>m</u> onophosphate)
<i>C. mogii</i> , <i>C. albicans</i>	<i>Candida mogii</i> , <i>Candida albicans</i>
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
demiH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová ( <u>e</u> thylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etra <u>a</u> cetic acid); chelatační činidlo, vyvazuje např. Ca <sup>2+</sup> ionty
EUROSCARF	<u>E</u> uropean <u>S</u> accharomyces <u>c</u> erevisiae <u>a</u> rchive for <u>f</u> unctional analysis
FG MAPK dráha	MAPK dráha regulující filamentární růst
G1, S, G2, M	fáze buněčného cyklu
GAP	<u>G</u> TPase- <u>a</u> ctivating <u>p</u> rotein; stimuluje aktivitu GTPázy, urychluje hydrolyzu GTP
GEF	<u>g</u> uanosine <u>e</u> xchange <u>f</u> actor; aktivuje GTPázu tím, že uvolňuje GDP a umožňuje navázání GTP
GFP	zelený fluorescenční protein ( <u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein)
GDP	guanosindifosfát ( <u>g</u> uanosine <u>d</u> iphosphate)
GPCR	receptor spřažený s G proteinem (patřícím mezi GTPázy); <u>G</u> protein- <u>c</u> oupled <u>r</u> eceptor
GPI	glykofosfatidylinositol ( <u>g</u> lycosyl <u>p</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol)
GPL	glykolipoprotein ( <u>g</u> lycopeptidolipid)
GTP	guanosintrifosfát ( <u>g</u> uanosine <u>t</u> riphosphate)
GTPáza	GTP fosfohydroláza; hydrolyzuje GTP na GDP
HA	hemaglutinin
HO endonukleáza	endonukleáza zajišťující u <u>h</u> omotalických kmenů výměnu alel v

	<i>MAT</i> lokusu a tedy přepnutí párovacího typu
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ( <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> )
ICP-OES	emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ( <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> )
MAPK	mitogeny aktivovaná proteinkináza ( <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
MAPKK,	mitogeny aktivovaná proteinkináza ( <i>MAP kinase kinase</i> )
MAPKKK	mitogeny aktivovaná proteinkináza ( <i>MAP kinase kinase kinase</i> )
MAPK kaskáda	mitogeny aktivovaná kaskáda proteinkináz (MAPK, MAPKK, MAPKKK)
MDR	mnohočetná léková rezistence ( <i>multiple drug resistance</i> )
mtDNA	mitochondriální DNA
MVB	multivezikulární tělísko ( <i>multivesicular body</i> )
n, 2n, 3n, 4n	haploidní (mající jednu sadu chromozómů), diploidní, triploidní, tetraploidní buňky
PAK	p21 aktivovaná kináza ( <i>p21-activated kinase</i> )
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PKA	proteinkináza A ( <i>protein kinase A</i> )
$\rho^0$	respiračně deficientní buňky postrádající mtDNA
$\rho^-$	respiračně deficientní buňky mající poškozenou mtDNA
ROS	reaktivní formy kyslíku ( <i>reactive oxygen species</i> )
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ssDNA	jednořetězcová DNA ( <i>single-stranded DNA</i> )

## Seznam termínů

biofilm	mnohobuněčná komunita, jejíž buňky adherují k pevnému povrchu a k sobě navzájem; vlastnosti biofilmu mají i „vrásčité“ kolonie a „maty“
blastospory	jednotlivé pučící kvasinkové buňky; např. u rodu <i>Candida</i>
buněčný agregát	velký shluk buněk, který je tvořen nespecificky spojenými buňkami; může obsahovat i buněčné klastry
buněčný klaster	shluk buněk vznikající nedokonalým oddělováním mateřských a dceřiných buněk při pučení

#### části kolonie:

okrajová část kolonie	okraj kolonie, který může mít podobu úzkého plochého okrajového lemu, nebo naopak výrazně vyvýšeného okrajového valu
středová část kolonie	centrální část kolonie tvořená nejstaršími buňkami, která odpovídá místu inokulace
středový val	vyvýšený prstencový útvar, který u některých kolonií ohraničuje středovou část kolonie
vnitřní část kolonie	v této práci použito pro celou kolonii s výjimkou úzkého a plochého okrajového lemu
dimorfní přeměna	u <i>S. cerevisiae</i> přeměna buněk kvasinkového typu na buňky pseudohyfální
fáze alkalická	fáze vývoje kvasinkových kolonií, během které buňky produkují amoniak a pH okolního média roste
fáze kyselá	fáze vývoje kvasinkových kolonií, během které klesá pH okolního média
filamentární růst	termín zahrnující invazivní růst a pseudohyfální růst u <i>S. cerevisiae</i> a také hyfální růst (např. u rodu <i>Candida</i> )
flór	povlak na povrchu zrajícího cherry vína
<i>fusel</i> alkoholu	přirozený produkt katabolizmu některých aminokyselin
invazivní růstová forma	kvasinková filamenta vrůstající do agarového média; typické zejména pro haploidní kmeny; někteří autoři používají tento termín výlučně pro haploidní kmeny
jizva zrodu	struktura na buněčné stěně kvasinek, pozůstatek původního připojení k mateřské buňce
jizvy	struktury na buněčné stěně kvasinek, pozůstatek po dceřiných pupenech, které se v minulosti oddělily

#### kolonie:

hladké kolonie	<i>simple colonies, smooth colonies</i> ; málo strukturované kolonie typické pro laboratorní kmeny
mikrokolonie	mladé monokolonie tvořené malým množstvím buněk; jednotlivé buňky je možno sledovat v mikroskopu a vyhodnotit např. typ pučení
monokolonie	kolonie, která vyrostla z jediné původní buňky
obří kolonie (makrokolonie)	kolonie, která vyrostla z kapky buněčné suspenze (např. $10^6$ buněk/10 $\mu$ l vody)
„vrásčité“ kolonie	<i>„fluffy“ colonies, colony biofilms</i> ; výrazně trojrozměrně strukturované kvasinkové kolonie typické pro přírodní a klinické izoláty <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

kmen:

divoký (přírodní)	kmen izolovaný z přírodního stanoviště
domestikovaný	kmen, který po opakované kultivaci na komplexním médiu v laboratorních podmínkách ztratil specifické vlastnosti divokého kmene
mutantní	kmen nesoucí určitou mutaci
rodičovský	kmen, ze kterého byl připraven mutantní kmen
kvasinková forma buňky	samostatná buňka netvořící filamentum
„maty“	<i>mats</i> ; typ biofilmu; kvasinkové maty jsou specifický typ kolonií rostoucí na nedostatečně ztuženém agarovém médiu
pól volný	pól buňky protilehlý k pólu zrodu
pól zrodu	pól buňky nesoucí jizvu zrodu (místo, kde se buňka původně oddělila od mateřské buňky)
pseudohyfální forma buňky	buňka tvořící pseudohyfu, lišící se v mnoha ohledech od kvasinkové formy buňky
pseudohyfální růst	tvorba výrazně polarizovaných filament (pseudohyfy); typické zejména pro diploidní kmeny; někteří autoři používají tento termín výlučně pro diploidní kmeny
pseudomycelium	pseudohyfální vlákna
<u>pučení – typy:</u>	
axiální pučení	pučení typické pro haploidní buňky; nové pupeny vznikají v blízkosti jizvy zrodu
bipolární pučení	pučení typické pro diploidní buňky; pupeny vznikají na protilehlých pólech buňky
monopolární pučení	pučení typické pro pseudohyfální buňky; pupeny vznikají na volném pólu (pól protilehlý pólu zrodu)
náhodné pučení	umístění pupenů na kvasinkové buňce je náhodné
polární pučení	monopolární nebo bipolární pučení; typické pro diploidní buňky
<i>quorum sensing</i>	mechanismus komunikace mikrobiálních buněk sloužící k rozpoznávání hustoty populace a koordinaci chování buněčných populací
rapamycin (sirolimus)	makrolidové antibiotikum produkované <i>Streptomyces hygroscopicus</i> ; inhibuje klíčovou proteinkinázu Tor
<i>scaffold</i> protein	interaguje s více proteiny signální dráhy a drží je v komplexu
<i>sliding motility</i>	specifický způsob pohybu některých bezbičíkatých bakterií založený na sníženém tření mezi buňkami a substrátem



## Abstrakt

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* jako jednobuněčný organizmus patří mezi nejstudovanější experimentální organizmy. Je důležitým modelovým organismem pro studium intracelulárních procesů v eukaryotických buňkách. Ovšem kvasinky jsou rovněž sociální organizmy schopné mezibuněčné komunikace a tvorby organizovaných mnohobuněčných struktur (kolonií a biofilmů). Kvasinky stejně jako další mikroorganizmy při růstu v přírodě upřednostňují tvorbu organizovaných mnohobuněčných struktur na pevných površích před růstem v planktonní formě, tedy jako individuální buňky (Palková, 2004; Wimpenny, 2009). Pro kvasinku *S. cerevisiae* je typická tvorba kolonií, biofilmy byly popsány jen výjimečně. Kvasinkové kolonie se vyznačují rozmanitými morfologiemi, které jsou pro různé kmeny charakteristické (Kocková-Kratochvílová, 1982).

Tato práce se zabývá morfologií a diferenciací kolonií *S. cerevisiae* běžných laboratorních kmenů, tvořících málo strukturované kolonie, a kmenů s genetickým pozadím  $\Sigma 1278b$ , tvořících vysoce strukturované „vrásčité“ kolonie. Ukazuje, že polarizovaný typ pučení a zejména schopnost buněk tvořit agregáty umožňují vznik strukturované morfologie. Při vývoji „vrásčitých“ kolonií dochází ke dvěma rozdílně regulovaným dimorfním přeměnám kvasinkových buněk na pseudohyfální růst; při jedné z nich se uplatňuje povrchový glykoprotein, flokulin Flo11p. Předkládaná práce se zabývá také vlivem amoniaku a metylaminu na morfologii a diferenciaci kolonií a na expresi genu kódujícího domnělou permeázu amonných iontů Ato1p. Bylo zjištěno, že amoniak, který funguje jako signální molekula a zajišťuje signalizaci na dlouhou vzdálenost mezi jednotlivými koloniemi (Palková *et al.*, 1997), rovněž indukuje tvorbu pseudohyf.

Dalším cílem práce byla příprava nové metody pro detekci přítomnosti živin a dostupnosti kyslíku uvnitř kvasinkových kolonií. Tato metoda využívá kmeny s modifikovanou drahou biosyntézy purinů (AMP dráha), jejichž buňky v přítomnosti specifických látek změní svou barvu na červenou. Stejná metoda byla použita pro detekci měďnatých iontů v tekutém médiu.

**Klíčová slova:** *Saccharomyces cerevisiae*, kvasinkové kolonie, morfologie kolonie, diferenciacie, pseudohyfální růst, *FLO11*, amoniak, metylamin, *ATO1*, biosenzor, *ADE2*, měďnaté ionty

## Abstract

Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as an unicellular organism is one of the best-studied experimental organisms. It is an important model organism for the study of intracellular processes of eukaryotic cells. Yeasts are also social organisms with cell-to-cell communication able to form organized multicellular structures (colonies and biofilms).

Yeast and other microorganisms in nature prefer to form colonies on solid substrates rather than to grow as “planktonic” single cells (Palková, 2004; Wimpenny, 2009). The yeast *S. cerevisiae* typically forms colonies, biofilms were described only rarely. Yeast colonies exhibit an organized morphological pattern characteristic of each particular yeast strain (Kocková-Kratochvílová, 1982).

This work is focusing on morphology and differentiation of the *S. cerevisiae* colonies of common laboratory strains forming less structured colonies, and strains of the  $\Sigma$ 1278b genetic background forming highly structured “fluffy” colonies. It shows that polarized budding pattern and especially cell ability to form aggregates enable development of structured morphology. During development of “fluffy” colonies two differently regulated events of dimorphic switch from yeast form to filamentous growth occur. One of these events is dependent on the surface glycoprotein, Flo11p flocculin. This thesis also investigates influence of ammonia and methylamine on yeast colony morphology and differentiation and also on gene expression of the *ATO1* gene encoding putative ammonium transporter. It was found that ammonia, which functions as a volatile signal molecule and exhibits long-distance signals between neighbouring colonies (Palková *et al.*, 1997), also induces pseudohyphal growth.

The last aim of my thesis was development of a new method for detection of nutrients and oxygen level inside yeast colonies. This method uses strains with modified biosynthetic pathway of purines (AMP pathway). Cells of these strains change its colour to red in the presence of specific compounds. The same method was used for detection of copper ions in liquid medium.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, yeast colonies, colony morphology, differentiation, pseudohyphal growth, *FLO11*, ammonia, *ATO1*, biosensor, *ADE2*, copper ions

## 1 ÚVOD

---

Kvasinkové buňky rostoucí na pevném podkladu vytvářejí organizované mnohobuněčné struktury – kolonie (obr. 1.1). Rozlišujeme monokolonie, které vznikly dělením jediné původní buňky (kvasinkový klon), a obří kolonie (makrokolonie), které vznikly dělením většího počtu buněk. Obří kolonie připravujeme nanesením kapky buněčné suspenze na agarové živné médium. Struktura kolonie je formována buňkami, jejichž chování a množení v rámci kolonie není náhodné. Svědčí o tom mimo jiné i skutečnost, že morfologie kolonie daného kmene mikroorganismu je za daných podmínek vždy shodná a přitom pro různé kmeny mikroorganismů rozdílná (Kocková-Kratochvílová, 1982).



**Obr. 1.1.** Obří kolonie různých kmenů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

Při vytváření těchto mnohobuněčných struktur dochází k nejrozdílnějším interakcím mezi dělicími se buňkami uvnitř struktury. Při vývoji kolonie se jistě uplatňuje způsob pučení, který se u různých kvasinek liší. U druhu *Saccharomyces cerevisiae* je typ pučení rozdílný pro haploidní a diploidní buňky, což bylo popsáno na buňkách rostoucích v tekutých kulturách (Hicks *et al.* 1977). V první části dizertační práce jsem zjišťovala, zda je regulace způsobu pučení v rámci kolonie obdobná jako při růstu v tekuté kultuře a jaký význam má způsob pučení pro morfogenezi kolonie. V rámci kolonie může docházet rovněž k diferenciaci buněk; nejznámější příklady této diferenciaci jsou přechod diploidních kvasinkových buněk z normálního buněčného cyklu do fáze vytváření vřecek, tj. sporulace (Freese *et al.*, 1982), nebo do fáze pseudohyfálního růstu (Gimeno *et al.*, 1992). V další části práce jsem proto studovala přeměnu buněk kvasinkového typu na buňky pseudohyfální (tzv. dimorfní přeměnu) v různých fázích vývoje kolonií. Popsala jsem její vliv na morfologii kolonií a zaměřila jsem se na úlohu flokulinu Flo11p, který se při pseudohyfálním růstu významně uplatňuje (Lo a Dranginis, 1998). Rovněž jsem zjišťovala, jak je výsledná morfologie kolonií ovlivněna schopností buněk flokulovat a agregovat.

Morfologie kolonií nezávisí pouze na interakcích mezi buňkami, které ji tvoří. Je významně ovlivňována i přítomností sousedních kolonií, které reagují na měnící se podmínky v průběhu růstu kolonie dané spotřebou živin, vylučováním různých metabolitů apod. Kromě interakcí mezi buňkami uvnitř kolonie se tedy u kvasinek uplatňuje rovněž signalizace na dlouhou vzdálenost mezi individuálními koloniemi. Jako jedna ze signálních molekul byla identifikována plynná molekula amoniaku, produkovaná koloniemi v určitých fázích vývoje během kultivace na živném médiu s glycerolem. Důsledkem produkce amoniaku je zvýšení pH v okolí kolonií. Během vývoje kolonií na médiu s pH indikátorem tak můžeme pozorovat střídání alkalických a kyselých fází vývoje kolonií, přičemž alkalická fáze je spojena s produkcí amoniaku a s dočasným zpomalením růstu kolonií (Palková *et al.*, 1997).

Jedním z dalších cílů mé práce bylo vypracovat metodiku pro umělé navození alkalické fáze vývoje kolonií pomocí plyných aminů (amoniaku a metylaminu), což by umožnilo podrobnější studium změn probíhajících na přechodu kyselá a alkalická fáze. Rovněž jsem studovala vliv plyných aminů na morfologii a diferenciaci kolonií.

V další části mé práce jsem zavedla novou metodu pro detekci přítomnosti živin a dostupnosti kyslíku uvnitř kvasinkových kolonií. Na tenkých řezech z kvasinkových kolonií je díky této metodě možné rozeznat aerobně respirující oblasti a oblasti s omezenou dostupností adeninu či galaktózy. Stejnou metodu je možno použít pro detekci živin a škodlivin (například měďnatých iontů) v tekutém médiu. Metoda je univerzální, umožňuje modifikovat systém tak, aby bylo možné detekovat i další živiny či škodliviny.

## 2 CÍLE PRÁCE

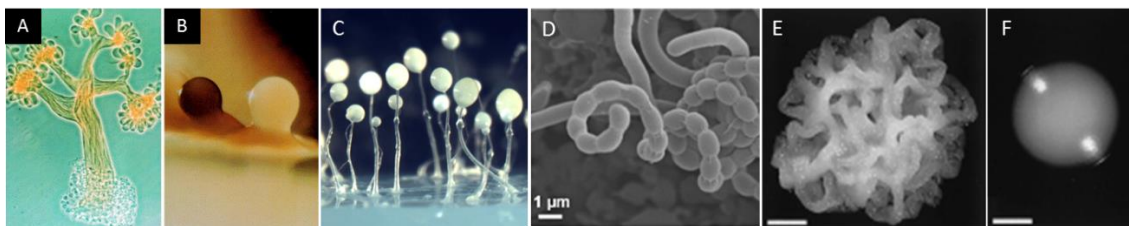
---

1. Zjistit, zda je regulace typu pučení v koloniích *Saccharomyces cerevisiae* stejná jako v tekutých kulturách a zda typ pučení ovlivňuje morfologii kolonií.
2. Zjistit, zda schopnost buněk tvořit shluky (flokulace, agregace) ovlivňuje morfologii kolonií *S. cerevisiae*.
3. Objasnit úlohu dimorfní přeměny kvasinkových buněk na pseudohyfální při vývoji kolonií kmenů odvozených od kmene *S. cerevisiae*  $\Sigma 1278b$  a také objasnit úlohu flokulinu Flo11p v různých fázích vývoje kolonií.
4. Najít vhodné podmínky pro účinnou indukci alkalické fáze u *S. cerevisiae* pomocí plyných aminů a popsat vliv těchto aminů na morfologii kolonií a na expresi fúzního proteinu Ato1p-GFP.
5. Pokusit se připravit novou metodu pro detekci přítomnosti živin a dostupnosti kyslíku uvnitř kvasinkových kolonií.
6. Využít nově vyvinutou metodu pro detekci měďnatých iontů v tekutém médiu.

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

Na kvasinky (a také na bakterie) se tradičně nahlíželo jako na jednotlivé od sebe oddělené nezávisle rostoucí buňky, jak to také odpovídá běžné kultivaci v tekutých živných médiích v laboratořích. Při tomto způsobu kultivace je kultura promíchávána, což zajišťuje stejnou koncentraci živin, odpadních látek i plynů v celém objemu média; kultivace probíhá za optimální teploty. Všechny buňky se tak vyvíjejí za stejných podmínek, kultura je homogenní, přičemž jednotlivé buňky nejsou vzájemně v kontaktu. Ke studiu je většinou používána kultura v exponenciální fázi růstu. V přirozeném prostředí se však s takovýmto způsobem růstu těžko setkáme. Mikroorganismy v přírodě musí čelit výkyvům teplot, nedostatku živin a nedostatečné vlhkosti a jen vzácně se chovají jako samostatná jednobuněčná individua. V přírodě je pro ně naopak typická tvorba mnohobuněčných struktur (např. plodnice, kolonie, biofilmy) nejčastěji na pevných površích, při níž jsou buňky vzájemně v kontaktu, komunikují prostřednictvím signálních molekul a jsou vystaveny gradientu živin a dalších látek. Typickým znakem těchto mnohobuněčných struktur je diferenciací buněk, která vede ke vzniku různých subpopulací s odlišnými vlastnostmi v rámci mnohobuněčné struktury. Schopnost jednobuněčných organismů tvořit mnohobuněčné struktury společně se schopností diferenciací je jedním z mechanismů zajišťujících přežití v přírodních podmínkách (Costerton *et al.*, 1995; Wimpenny, 2009).

Existence diferencovaných mnohobuněčných útvarů byla původně známá jen u některých jednobuněčných organismů (např. u myxobakterií, streptomycet a hlenky *Dictyostelium discoideum*). Gramnegativní myxobakterie (např. *Myxococcus xanthus*) se vyznačují klouzavým pohybem a vývojovým cyklem s tvorbou plodnic (obr. 3.1A,B). Plodnice vznikají při nedostatku živin agregací pohyblivých buněk. Pohyb se děje bez účasti jakýchkoliv pohybových organel za produkce extracelulární matrix. Některé buňky v plodnici se mění na kulaté klidové buňky (myxospory) se zvýšenou odolností vůči nepříznivým vlivům prostředí (Shimkets, 1990). Grampozitivní bakterie rodu *Streptomyces* mají schopnost tvořit mycelium. U kolonií streptomycet rozeznáváme vzdušné mycelium, vyrůstající z povrchové části kolonie, a substrátové mycelium, které prorůstá do substrátu. Fragmentací hyf vzdušného mycelia vznikají spory (přehledový článek Shapiro, 1998; obr. 3.1D). U eukaryotické hlenky *D. discoideum* dochází při hladovění k agregaci pohyblivých améb do mnohobuněčné struktury. Následnou diferenciací buněk postupně vzniká takzvané pseudoplasmodium a případně plodnice (fruktifikační tělísko) v níž se tvoří spory (Gross., 1994; obr. 3.1C).



**Obr. 3.1.** Mnohobuněčné útvary jednobuněčných organismů. Plodnice myxobakterií *Chondromyces crocatus* (výška ~850  $\mu\text{m}$ ; A) a *Myxococcus fulvus* (průměr ~250  $\mu\text{m}$ ; B) a hlenky *Dictyostelium discoideum* (výška 1-4 mm; C). Vzdušné mycelium se sporami bakterie *Streptomyces coelicolor* (D). „Vrásčitá“ monokolonie kvasinky *S. cerevisiae* BR-F (E) a domestikovaného kmene *S. cerevisiae* BR-S (F). Měřítko 2 mm. (Převzato z Crespi, 2001; Strassmann a Queller, 2011; Jakimowicz a van Wezel, 2012; Kuthan *et al.*, 2003).

Diferenciační procesy u těchto organismů byly dlouho považovány za jevy výjimečné. Mnohobuněčnost byla chápána jako pouhá adaptivní strategie omezená jen na určité skupiny jednobuněčných organismů. Situace se však změnila a bakteriální kolonie a biofilmy (povlaky

na abiotickém materiálu, který je ve styku s vodným prostředím) běžných bakteriálních druhů začaly být považovány za vysoce organizované a strukturované mnohobuněčné útvary. Mezbuněčná komunikace a koordinované mnohobuněčné aktivity jsou nyní vnímány jako obecné vlastnosti bakterií (Donlan a Costerton, 2002).

Stejně tak eukaryotické jednobuněčné organizmy kvasinky se v přírodě vyskytují převážně jako biofilmy a kolonie (Palková a Váchová, 2006). Tvorba biofilmu byla popsána například u druhů *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon asahii*, *Malassezia pachydermatis* (přehledový článek Martinez a Fries, 2010). U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byla tvorba typického biofilmu pozorována jen výjimečně.

Typickým mnohobuněčným útvarem kvasinky *S. cerevisiae* je tedy kolonie, a jako taková je studována v naší laboratoři. Studujeme jednak morfologii a diferenciaci kolonií divokých kmenů izolovaných z přírody, které se vyznačují komplexní strukturovanou morfologií („vrásčitá“ morfologie), ale studujeme i diferenciaci uvnitř kolonií běžných laboratorních kmenů (např. kmen BY4742), jejichž morfologie je většinou relativně hladká. Jedním z mála laboratorních kmenů, které tvoří „vrásčité“ kolonie, je kmen  $\Sigma 1278b$  a kmeny od něj odvozené. Specifická trojrozměrná struktura „vrásčitých“ kolonií divokých kmenů je závislá na přítomnosti extracelulární matrix (ECM) a flokulinu Flo11p (Palková, 2004; Šťovíček *et al.*, 2010), které zajišťují integritu útvaru. Charakteristickým rysem kmenů s „vrásčitou“ morfologií je ztráta jejich typických vlastností a změna morfologie kolonií při delší kultivaci v laboratorních podmínkách. Tento jev se nazývá domestikace; domestikované kmeny tvoří málo strukturované kolonie podobné hladkým koloniím laboratorních kmenů; domestikované kmeny neprodukují ECM (Kuthan *et al.*, 2003).

Diferenciaci kolonií studujeme především na živném médiu s glycerolem jako zdrojem uhlíku (GM médium). Kolonie rostoucí na tomto médiu mají výrazněji strukturovanou morfologii než kolonie rostoucí na živném médiu s glukózou (Granek a Magwene, 2010). Médium s glukózou je pro studium diferenciaci nevhodné také proto, že na něm dochází s vyšší pravděpodobností k domestikaci divokých kmenů (Šťovíček *et al.*, 2014). U kolonií různých kvasinkových rodů rostoucích na GM médiu byla popsána alkalizace živného média a signalizace pomocí amoniaku (Palková *et al.*, 1997). Kolonie na tomto médiu procházejí vývojovými změnami, které jsou charakterizovány změnami pH v okolí kolonií (střídání dvou alkalických a jedné nebo dvou kyselých fází; obr. 3.2). Alkalizace je spojena s produkcí plyného amoniaku, který funguje jako signální molekula a indukuje u okolních kvasinkových kolonií jejich vlastní produkci amoniaku a vstup do alkalické fáze. Výsledkem je synchronizace vývoje blízkých kolonií (Palková a Forstová, 2000). Přejít z kyselého do alkalické fáze vývoje relativně hladkých kolonií kmene *S. cerevisiae* BY4742 je spojen s výraznou změnou metabolismu buněk (Palková *et al.*, 2002) a s diferenciací buněk ve středové části kolonie na subpopulaci U buněk (*upper*, horní vrstva buněk) a L buněk (*lower*, spodní vrstva; Váchová *et al.*, 2009a; Čáp *et al.*, 2012). U buňky v porovnání s L buňkami jsou mimo jiné více odolné vůči stresu, neprodukují ROS (reaktivní formy kyslíku), akumulují glykogen a lipidové partikule, což jsou znaky klidových buněk (*quiescent cells*). Nicméně U buňky se také chovají jako metabolicky aktivní a mají vlastnosti, které nejsou pro klidové buňky typické, probíhá v nich například glykolýza a metabolismus aminokyselin, exprimují se geny pro translaci. Překvapivě bylo u U buněk zaznamenáno snížení respirativního metabolismu. Charakteristika L buněk (např. zvýšená citlivost ke stresu, více ROS, snižování životaschopnosti, zvýšená exprese genů pro proteolýzu) naznačuje, že L buňky na úkor vlastní potřeby poskytují živiny pro U buňky (Čáp *et al.*, 2012).

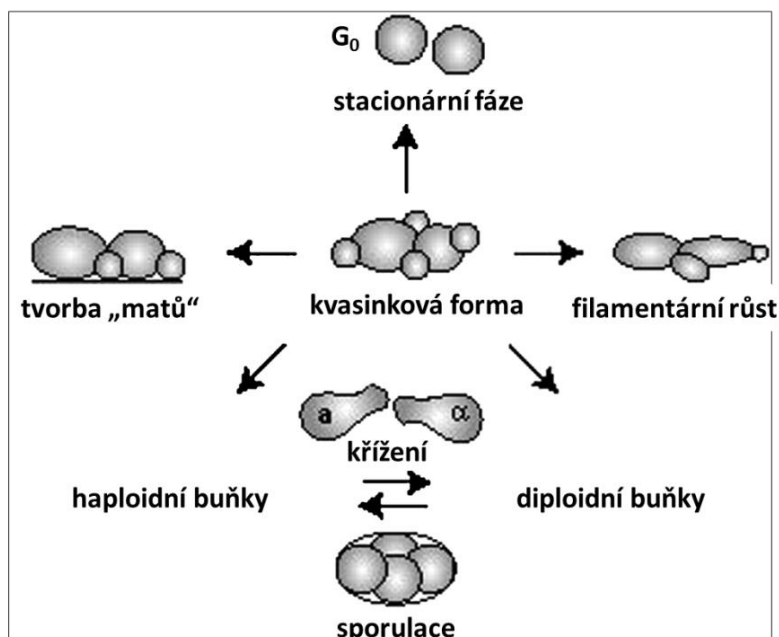
Diferenciace „vrásčitých“ kolonií divokých kmenů se od vývoje hladkých kolonií kmene BY4742 výrazně liší. Na povrchu „vrásčitých“ kolonií se vytváří vrstva nedělicích se stacionárních buněk (Váchová *et al.*, 2011), zatímco u hladkých kolonií se stacionární buňky objevují nejdříve ve vnitřní části kolonie (Čáp *et al.*, 2012). Existence povrchové vrstvy stacionárních buněk, které jsou více rezistentní vůči stresu, zvyšuje odolnost kolonií divokých

kmenů. V povrchové vrstvě byla navíc zaznamenána produkce MDR transportérů, zajišťujících odstraňování toxických látek z kolonie (Váchová *et al.*, 2011).



**Obr. 3.2.** Alkalické fáze a kyselá fáze vývoje obřích kolonií *S. cerevisiae* BY4742 na GM-BKP médiu s pH indikátorem. Živné médium je zbarveno fialově při zásaditějším pH a žlutě při kyseléjším pH. A) Během první alkalické fáze (přibližně po 1 dni kultivace) se pH zvyšuje pouze pod koloniemi. B) Během kyselé fáze vývoje (přibližně od 2. dne do 11. dne kultivace) se okyseluje okolí kolonií. C) Během druhé alkalické fáze (přibližně od 12. dne kultivace) dochází k silné alkalizaci okolí kolonií.

Uvnitř kvasinkových kolonií dochází také k diferenciaci na úrovni jednotlivých buněk, tedy k přeměně buňky ve vřeco obsahující spory (sporulace u diploidních kmenů) nebo k dimorfní přeměně samostatně rostoucí buňky na vláknitou vícebuněčnou formu (filamentární růst). Oba jevy jsou běžnou součástí životního cyklu kvasinkových buněk (obr. 3.3). Specifickou lokalizaci sporulujících buněk uvnitř kvasinkových kolonií *S. cerevisiae* popsali Piccirillo a Honigberg (2010). Autoři v koloniích pozorovali dvě ostře vymezené vrstvy sporulujících buněk, které byly odděleny vrstvou nesporulujících buněk. Protože stejnou lokalizaci těchto vrstev pozorovali u hladkých kolonií (kmen W303) i u „vrásčitých“ kolonií (kmen  $\Sigma$ 1278b a kmen SK1), nezdá se, že by sporulace měla významný vliv na morfologii kolonií. Oproti tomu různé morfologie kolonií kvasinky *Candida mogii* jsou spojovány s přítomností či nepřítomností vláknitých forem (hyfy, pseudohyfy; Palková a Forstová, 2000).



**Obr. 3.3.** Životní cyklus kvasinky *S. cerevisiae*. Haploidní i diploidní buňky mohou přepnout z kvasinkové formy na filamentární růst, tvořit biofilmy (tzv. „maty“) nebo při nedostatku živin (glukózy nebo zdroje dusíku) vstoupit do stacionární fáze. Diploidní buňky mohou při nedostatku živin (glukózy a zdroje dusíku) také sporulovat. (Upraveno podle Cullen a Sprague, 2012).

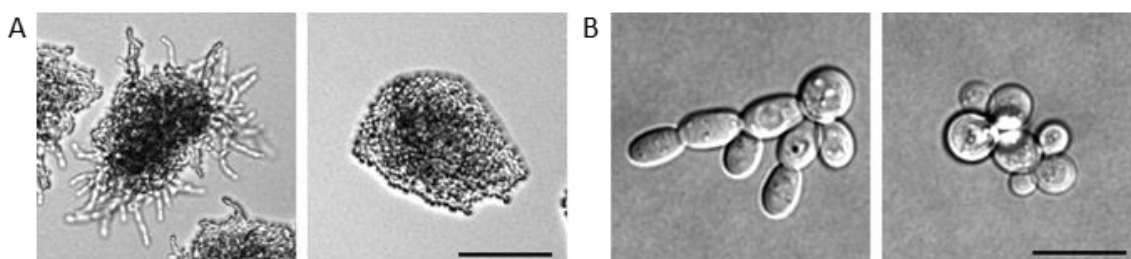


Ve své dizertační práci jsem se mimo jiné věnovala studiu „vrásčitých“ kolonií kmenů odvozených od  $\Sigma 1278b$ , které se vyznačují schopností tvořit pseudohyfy (Gimeno *et al.*, 1992). Protože jsme předpokládali, a to se potvrdilo, že přepínání na pseudohyfální růst hraje důležitou roli při vývoji kolonií tohoto kmene, vypracovala jsem podrobný literární přehled shrnující dosavadní poznatky o pseudohyfálním růstu u *S. cerevisiae*. Důležitou součástí tohoto přehledu je popis funkce flokulinu Flo11p, který je nezbytný nejen pro pseudohyfální růst, ale i pro flokulaci a agregaci buněk, které se rovněž podílejí na morfogenezi a diferenciaci kolonií.

### 3.1 FILAMENTÁRNÍ RŮST U KVASINKY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Alternativou k běžnému vegetativnímu množení je u *Saccharomyces cerevisiae* (především u kmenů izolovaných z přírody) filamentární růst (Casalone *et al.*, 2005), při kterém nevznikají samostatné oválné buňky, ale fragilní řetězce buněk, tzv. pseudohyfy (obr. 3.4). Pseudohyfy vznikají nedokonalým oddělováním buněk při pučení. Buňky sice dokončí cytokinezi a dokonale oddělí cytoplazmu mateřské a dceřiné buňky, nicméně zůstávají spojené prostřednictvím proteinů a polysacharidů buněčné stěny. Tím se liší od pravých hyf, které jsou typické pro kvasinky rodu *Candida*. Uvnitř hyf jsou buňky odděleny septem, které se vytváří během růstu vlákn. Buňky tvořící hyfu sdílejí společnou cytoplazmu a mohou být vícejaderné (přehledový článek Berman, 2006).

Tvorba pseudohyf byla u *S. cerevisiae* popsána již dávno, poprvé asi v roce 1920 u kmenů fermentujících hroznovou šťávu (Guilliermond, 1920). Šlo však pouze o popis morfologie buněk bez dalšího podrobnějšího studia. Teprve publikování výsledků práce laboratoře Massachusettského technologického institutu vedené G. R. Finkem v roce 1992 zahájilo etapu systematického studia tohoto jevu (Gimeno *et al.*, 1992). Autoři ukázali, že diploidní kmen *S. cerevisiae*  $\Sigma 1278b$  při růstu na pevném médiu s limitním množstvím dusíku tvoří pseudohyfy (obr. 3.4A). Většina poznatků o filamentárním růstu, které jsou uvedeny v následujících kapitolách, byla získána studiem kmenů odvozených od kmene  $\Sigma 1278b$ . Pokud u jednotlivých informací neuvádím použitý kmen, jedná se o kmen s genetickým pozadím  $\Sigma 1278b$ .



**Obr. 3.4.** A) Diploidní kmeny *S. cerevisiae* na živném médiu s chudým zdrojem dusíku. Vlevo rodičovský kmen tvořící pseudohyfy, vpravo kmen s poruchou tvorby pseudohyf. Měřítka 50  $\mu\text{m}$ . B) Haploidní kmeny *S. cerevisiae* na médiu bez glukózy. Vlevo pseudohyfální růst rodičovského kmene, vpravo kmen s poruchou tvorby pseudohyf. Měřítka 10  $\mu\text{m}$ . (Převzato z Cullen a Sprague, 2012).

### 3.1.1 VNĚJŠÍ FAKTORY NAVOZUJÍCÍ TVORBU PSEUDOHYF

---

#### 3.1.1.1 Dusíkové hladovění jako příčina tvorby pseudohyf

Gimeno *et al.* (1992) pozorovali, že diploidní kmen *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b na agarovém médiu s chudým zdrojem dusíku vytváří pseudomycelium tvořené pseudohyfami (obr. 3.4A). K této změně ve způsobu růstu docházelo na standardním minimálním médiu s nízkým obsahem amoniaku (0,05 mM síran amonný; SLAD médium) nebo na minimálním médiu s 0,1% prolinem jako jediným zdrojem dusíku. Pseudohyfy se netvořily při růstu na standardním minimálním médiu s vyšším obsahem amoniaku nebo při použití média, v němž byl prolin nahrazen jiným zdrojem dusíku (standardním množstvím amoniaku nebo argininem) anebo byl kombinován s dalším zdrojem dusíku (síranem amonným nebo argininem).

Přirozeným tekutým médiem s vysokým obsahem prolinu (koncentrace asi 10-100krát větší než koncentrace ostatních aminokyselin) je hroznová šťáva. Po vyčerpání ostatních menšinových zdrojů dusíku (amoniak, arginin a další) se stává výlučným zdrojem dusíku prolin, což vede k pseudohyfálnímu růstu. Právě v tomto médiu pozoroval pseudohyfální růst A. Guilliermond (Guilliermond, 1920).

Vliv dusíkového hladovění na pseudohyfální růst potvrdily rovněž pokusy s kmeny s mutací genu *SHR3* (Gimeno *et al.*, 1992). Gen *SHR3* kóduje integrální membránový protein endoplazmatického retikula, který se podílí na správné lokalizaci permeáz pro různé aminokyseliny. Mutace v tomto genu má za následek akumulaci permeáz v endoplazmatickém retikulu, což vede ke snížení transportu aminokyselin do buněk. Buňky proto i při kultivaci na médiu s dostatkem aminokyselin hladoví na dusík (Ljungdahl *et al.*, 1992). U diploidních kmenů *S. cerevisiae* s oběma alelami *SHR3* genu nefunkčními je tvorba pseudomycelia výraznější než u rodičovských kmenů. Na médiu se standardním množstvím síranu amonného rostou *SHR3* a *shr3* kmeny stejně rychle a pseudohyfy netvoří. Protože kmen *shr3* netvoří pseudohyfy, když médium obsahuje dostatek amonných iontů, je zřejmé, že pseudohyfální růst je vyvolán dusíkovým hladověním, které je důsledkem zhoršeného transportu zdrojů dusíku do buňky (Gimeno *et al.* 1992).

Jak bylo později ukázáno, dusíkové hladovění indukuje filamentární růst i u haploidních buněk (Lambrechts *et al.*, 1996, Cullen a Sprague, 2012).

#### 3.1.1.2 Invazivní růst

Roberts a Fink (1994) popsali u haploidních kmenů odvozených od *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b nový typ filamentárního růstu na bohatém médiu, který se od té doby označuje jako invazivní růstová forma. Pod koloniemi haploidních kmenů rostoucími několik dnů na bohatém médiu s glukózou objevili prodloužené buňky, které rostly pod povrchem agaru jako rozvětvená vlákna nerozdělená na jednotlivé buňky. Měly změněný typ pučení - nepučely axiálně, jak je pro haploidní buňky typické, ale polárně. Diploidní kmeny se stejným genetickým pozadím byly výrazně méně invazivní než kmeny haploidní.

Cullen a Sprague (2002) naopak pozorovali na bohatém médiu výraznější invazivní růst u diploidních kmenů (odvozených od  $\Sigma$ 1278b). Invazivní růst diploidních kmenů studovali ve své první práci rovněž Gimeno *et al.* (1992). Na agarovém médiu s prolinem byly některé mutované diploidní buňky (např. *shr3* mutace) invazivní a vrůstaly do agaru. Vlákna v agaru byla tvořena přibližně stejným počtem buněk jako vlákna na povrchu.

Galitski *et al.* (1999) porovnávali invazivní růst u haploidních až tetraploidních kmenů (odvozených od  $\Sigma 1278b$ ), a to obou párovacích typů, homozygotních i heterozygotních. Ukázalo se, že invazivita kmene klesá s rostoucí ploidíí, a to nezávisle na párovacím typu.

Invazivní růst je tedy typický spíše pro haploidní buňky. Není podmíněn dusíkovým hladověním, probíhá i na živinami bohatém médiu. Buňky nejsou tak protáhlé jako u pseudohyfálního růstu (Roberts a Fink, 1994; Cullen a Sprague, 2002).

### 3.1.1.3 Glukózové hladovění jako příčina filamentárního růstu

Invazivní růst byl pozorován také při kultivaci kmenů *S. cerevisiae* s jiným genetickým pozadím než  $\Sigma 1278b$ . Jednalo se o kmeny kultivované na médiu s dostatkem dusíku a s pomalu využívaným zdrojem uhlíku, jako je škrob nebo maltotrióza. Invazivní růst spojený s tvorbou pseudohyf byl stejně intenzivní u haploidních i diploidních kmenů. U jednoho z použitých haploidních kmenů bylo ověřeno, že tvoří pseudohyfy i na médiu s chudým zdrojem dusíku (Lambrechts *et al.*, 1996).

Nedostatek glukózy jako příčinu pseudohyfálního růstu u haploidů s genetickým pozadím  $\Sigma 1278b$  prokázali Cullen a Sprague (2000), kteří sledovali růst mladých monoklonií (mikrokolonií) na pevném médiu (obr. 3.4B). V nepřítomnosti glukózy (nebo jiného fermentovatelného cukru: sacharóza, manóza, fruktóza) se buňky již během prvního buněčného cyklu protahovaly a přecházely na neaxiální typ pučení. Více než 95 % monoklonií přepnulo na filamentární růst. Když použili glycerol nebo glykogen jako jediný zdroj uhlíku, nepozorovali už vůbec žádné monokolonie axiálně pučících buněk. To je podstatný rozdíl oproti pseudohyfálnímu růstu diploidních buněk při nedostatku dusíku, kde je pouze část buněk (5 - 25 %) ve filamentární formě (Kron *et al.*, 1994; Mösch a Fink, 1997).

(Cullen a Sprague (2002) později publikovali, že nedostatek glukózy indukuje filamentární růst také u diploidních buněk s pozadím  $\Sigma 1278b$ .

### 3.1.1.4 *Fusel* alkoholy stimulují filamentární růst

Kromě nedostatku živin (dusíkové hladovění nebo nedostatek glukózy) stimuluje filamentární růst také přítomnost tzv. *fusel* alkoholů. *Fusel* alkoholy jsou přirozeným produktem katabolizmu některých aminokyselin (Webb a Ingraham, 1963). Jedná se o aminokyseliny s větveným řetězcem (valin, leucin, isoleucin) a také o aromatické aminokyseliny (tryptofan, fenylalanin a tyrosin). Mezi *fusel* alkoholy patří alkoholy s krátkým uhlíkatým řetězcem a aromatické alkoholy.

### 3.1.1.5 Alkoholy s krátkým uhlíkatým řetězcem

Dickinson (1996) pozoroval typický filamentární růst při kultivaci haploidních i diploidních buněk *S. cerevisiae* (kmeny IWD72, W303-1A,  $\Sigma 1278b$  aj.) v tekutém komplexním médiu s 0,25% koncentrací isoamylalkoholu (produkt katabolizmu leucinu). Stejný autor studoval vliv i dalších *fusel* alkoholů na morfologii buněk. Kromě isoamylalkoholu silně indukoval pseudomyceliální formu rovněž n-amylalkohol (patrně produkt katabolizmu isoleucinu). Vliv aktivního amylalkoholu (katabolizmus isoleucinu) a isobutanolu (katabolizmus valinu) byl slabší, vliv n-propanolu (katabolizmus threoninu), n-butanolu (katabolizmus threoninu) n-

hexanolu (neznámý původ) byl velice slabý. Alkoholy, které nejsou produkty katabolismu aminokyselin (isopropanol, 2-fenyletanol) neměly na morfologii žádný vliv (Dickinson, 1996).

Pokud však byly haploidní i diploidní kmeny kultivovány v tekutém komplexním médiu s vyšší (0,5%) koncentrací isoamylalkoholu, vznikaly nestandardní pseudohyfám podobné útvary (Dickinson, 1996). Stejně útvary byly popsány již dříve při kultivaci několika haploidních kmenů *S. cerevisiae* v tekutém minimálním médiu s 2% etanolem a 2% leucinem. Růst v tekutém médiu byl charakterizován dvoufázovým nárůstem biomasy. Po první fázi proliferace zůstala biomasa přibližně 100 hodin konstantní. Potom následovala druhá fáze proliferace, která byla kolem 360. hodiny vystřídána stacionární fází. V období klidu mezi oběma fázemi růstu buňky produkovaly netypické pseudohyfy. Buňky nabývaly mnoha zvláštních tvarů, byly velmi dlouhé (32 – 37  $\mu\text{m}$ ), v délce zaškrcované, se společnou cytoplazmou. Přeměna na pseudomyceliální formu byla ireverzibilní. I při tomto experimentu se jednalo o vliv isoamylalkoholu, který se však vytvořil přirozeně (v nadměrném množství) jako produkt katabolismu leucinu, což byl jediný zdroj dusíku v použitém médiu (Dickinson, 1994).

Rovněž Lorenz *et al.* (2000a) indukovali haploidní a diploidní buňky pomocí isoamylalkoholu a n-butanolu. U kmenů odvozených od  $\Sigma 1278b$  pozorovali standardní filamentární růst; u kmenů odvozených od kmene W303 pozorovali rozmanité morfologie někdy připomínající pseudohyfy či hyfy; u kmenů s pozadím S288C nepozorovali žádnou změnu morfologie.

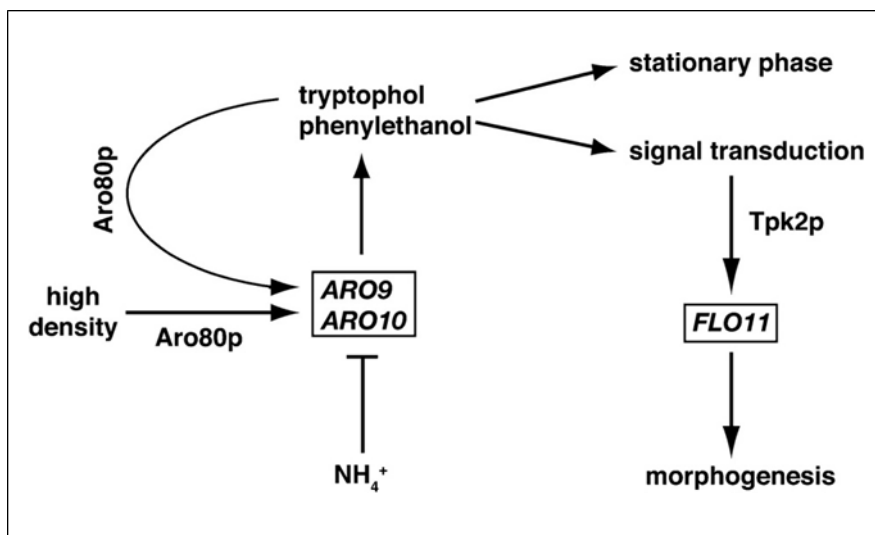
*Fusel* alkoholy mohou být pro kvasinkovou buňku indikátorem nedostatku kvalitního zdroje dusíku. Pokud jsou tyto alkoholy přidány do komplexního média, je možné, že buňky reagují na domnělý nedostatek dusíku a tvoří pseudohyfy.

#### 3.1.1.6 Aromatické alkoholy - *Quorum sensing*

Ukázalo se, že kvasinky *S. cerevisiae* odvozené od  $\Sigma 1278b$  přepínají na filamentární růst při dosažení určité buněčné hustoty, přičemž indikátorem hustoty populace jsou v tomto případě sekretované aromatické alkoholy. Odpověď na tyto alkoholy byla identifikována jako *quorum sensing* (Chen a Fink, 2006).

Aromatické alkoholy odvozené od tryptofanu a fenylalaninu (tryptofol a fenyletanol) jsou buňkami sekretovány do extracelulárního prostoru. Při vysoké buněčné denzitě tyto alkoholy prostřednictvím transkripčního faktoru Aro80p indukují expresi genů *ARO9* a *ARO10*, které jsou nezbytné pro biosyntézu tryptofolu a fenyletanolu. Dochází tak k autostimulaci (pozitivní zpětnovazební kontrola; obr. 3.5). Tryptofol a fenyletanol indukují přepnutí na filamentární růst, a to zvýšením exprese genu *FLO11* prostřednictvím podjednotky proteinkinázy A (Tpk2p), která je součástí RAS/PKA dráhy (viz kapitola 3.1.4.1). Produkce aromatických alkoholů je kontrolována nejen buněčnou denzitou, ale také koncentrací amonných iontů v extracelulárním prostředí. Vysoká koncentrace amonných iontů inhibuje transkripci genů (*ARO9*, *ARO10*) nezbytných pro biosyntézu aromatických alkoholů. Nízká koncentrace amonných iontů biosyntézu naopak aktivuje. Aromatické alkoholy rovněž regulují expresi mnoha genů stacionární fáze (obr. 3.5).

Butanol ani isoamylalkohol neměly u použitých kmenů žádný vliv na morfologii buněk (Chen a Fink, 2006). U kvasinky *Candida albicans* byl jako *quorum sensing* molekula identifikován jiný aromatický alkohol, tyrosol (Chen *et al.*, 2004).



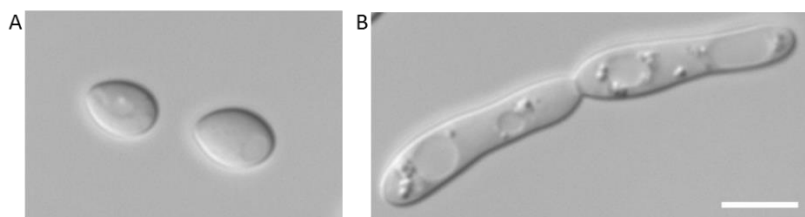
Obr. 3.5. Quorum sensing signální dráha. (Převzato z Chen a Fink, 2006).

### 3.1.2 KVASINKOVÉ A PSEUDOHYFÁLNÍ BUŇKY JSOU ODLIŠNÉ BUNĚČNÉ TYPY

Diferenciace buněk kvasinkového typu (jednotlivé buňky tvořící filamenta) v buňky pseudohyfálního typu je spojena s prodlužováním buněk, změnou polaritu pučení (přepnutí na monopolární pučení), omezením pučení u mateřských buněk, změnou regulace buněčného cyklu (regulace v G2/M fázi), zesílením mezibuněčné adheze (produkce adhezinu Flo11p) a neoddělováním buněk po cytokinezi. Vzniká tak unikátní morfologický typ, který usnadňuje pronikání do nových prostředí a hledání živin.

#### 3.1.2.1 Tvar pseudohyfálních buněk

Buňky kvasinkového a pseudohyfálního typu se nápadně liší už svým tvarem (obr. 3.6.). Například buňky *S. cerevisiae* s mutací *shr3* rostoucí na komplexním médiu jsou kvasinkového typu. Mají elipsoidní tvar, jejich délkošířkový poměr je 1,4. Pseudohyfální buňky stejného kmene na médiu s prolinem jsou protáhlé s délkošířkovým poměrem 3,5. Pseudohyfální buňky kmene *S. cerevisiae* s mutací *RAS2<sup>val19</sup>* jsou dokonce ještě delší. Lze se domnívat, že zvětšení poměru povrchu buněk vzhledem k jejich objemu znamená adaptaci na nové podmínky prostředí a umožňuje zvětšení plochy pro příjem živin (Gimeno *et al.*, 1992).



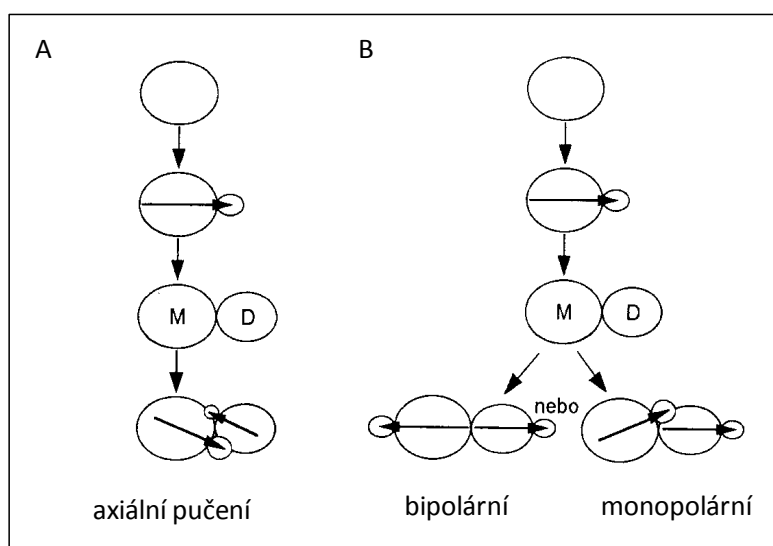
Obr. 3.6. *S. cerevisiae*  $\Sigma 1278^d$ . A) Buňky kvasinkového typu. B) Buňky pseudohyfálního typu. Měřítka 3  $\mu\text{m}$ .

Protáhlé pseudohyfální buňky dávají vznik nejen dceřiným buňkám stejného typu, ale také kulatým či oválným buňkám podobným blastosporám, které svým tvarem připomínají buňky kvasinkového typu. Tyto buňky jsou umístěny buď apikálně, nebo laterálně a začínají pučet z báze pseudohyfy potom, co pseudohyfa pronikne do agaru. Pseudohyfa, která přestala růst, bývá těmito buňkami celá pokrytá. Alespoň některé z těchto buněk, které připomínají blastosporu u *C. albicans*, aktivně prolifерují (Gimeno *et al.*, 1992).

### 3.1.2.2 Typ pučení

Kron *et al.* (1994) sledovali pomocí barvení jizev po pučení fluorescenčním barvivem calcofluorem, jak probíhá zakládání pupenů u diploidních buněk rostoucích na médiu s dostatkem dusíku v oválné kvasinkové formě a u buněk vytvářejících pseudohyfy při růstu za nedostatku dusíku. U obou typů buněk se první pupen objevil vždy na volném pólu, tedy na pólu protilehlém k pólu s jizvou zrodu (místo spojení s mateřskou buňkou). Tento typ pučení se nazývá polární a je pro diploidní kmeny typický (Hicks *et al.*, 1977). U buněk kvasinkového typu rostl druhý pupen opět na volném pólu pouze u 71 % buněk. Po třetím pučení byly všechny tři pupeny na volném pólu jen u 26 % buněk. Buňky kvasinkového typu tedy pučí bipolárně (obr. 3.7B). U pseudohyf se ale uplatňuje jiný typ pučení. Ukázalo se, že pseudohyfální buňky pučí monopolárně. Nejen první, ale i druhý pupen rostl ve 100 % případů na volném pólu, všechny tři pupeny se zde vyskytovaly v 97 % případů (obr. 3.7B). Dokonce byly pozorovány i pseudohyfální buňky s osmi jizvami na jednom pólu (Kron *et al.*, 1994).

Pro haploidní kmeny je typické axiální pučení. Při axiálním pučení vznikají nové pupeny na dceřiné buňce v blízkosti místa původního spojení s mateřskou buňkou, tj. u pólu zrodu. Mateřská buňka znovu pučí těsně vedle předešlého dceřiného pupenu (Hicks *et al.*, 1977; obr. 3.7A). Předpokladem pro filamentární růst haploidních buněk je přepnutí axiálního typu pučení na monopolární, protože lokalizace pupenů při axiálním pučení neumožňuje tvorbu filament.



**Obr. 3.7.** A) Axiální pučení haploidních buněk. B) Polární pučení diploidních buněk. M = mateřská buňka, D = dceřiná buňka. (Upraveno podle Chant, 1996).

Naopak monopolární pučení tvorbu pseudomycelia umožňuje. Opakované monopolární pučení terminálních pseudohyfálních buněk vede k prodlužování vlákna. Druhý pupen terminální buňky je základem laterálního vlákna. V některých případech k laterálnímu pučení

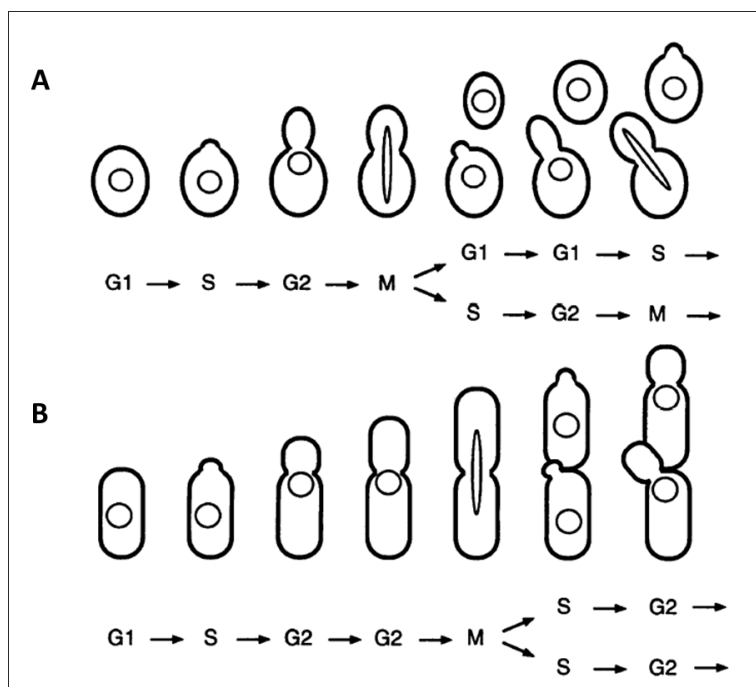
nedochází, neboť se mateřská buňka po oddělení první dceřiné buňky už dále nedělí. Projevuje se zde tedy jev známý jako apikální dominance (Gimeno *et al.*, 1992). Při studiu septa dělicího mateřskou a dceřinou buňku pseudomycelia nebylo nalezeno žádné cytoplazmatické spojení obou buněk. Absence propojení mezi buňkami vlákna je dokladem toho, že se nejedná o pravé mycelium (hyfální růst; Kron *et al.*, 1994).

### 3.1.2.3 Průběh buněčného cyklu

Studium charakteristik buněčného cyklu u pseudohyfálních buněk *S. cerevisiae* L5439 přineslo následující překvapivá zjištění.

#### Dělení pseudohyfálních buněk je symetrické.

Dělení buněk kvasinkového typu u *S. cerevisiae* při růstu na bohatém médiu je asymetrické. Objem právě oddělené dceřiné buňky představuje průměrně 65 % objemu buňky mateřské. V G1 fázi buněčného cyklu dceřiná buňka dorůstá (obr. 3.8A). Buňky téhož kmene rostoucího za nedostatku dusíku v pseudohyfální formě se dělí symetricky. Fáze pučení u nich trvá déle než u buněk kvasinkových. Tvorba septa nastává až tehdy, kdy je objem mateřské buňky a pupenu téměř stejný (obr. 3.8B). Objem dceřiné pseudohyfální buňky odpovídá přibližně 103 % objemu buňky mateřské (Kron *et al.*, 1994).



**Obr. 3.8.** Buněčný cyklus buňky kvasinkového typu (A) a pseudohyfálního typu (B). (Převzato z Kron *et al.*, 1994).

#### Mateřské a dceřiné buňky pseudohyfálního typu pučí synchronně.

U buněk kvasinkového typu se pupeny na mateřských a dceřiných buňkách objevují asynchronně. Druhý pupen na mateřské buňce se objeví dříve než první pupen na její dceřiné buňce, přičemž zpoždění je přibližně 20 minut. Oproti tomu u pseudohyfálních buněk probíhá

pučení synchronně. Pupeny se na mateřských a dceřiných buňkách objevují brzy po rozdělení, a to buď stejně rychle, anebo u dceřiné buňky přibližně o 3 minuty dříve (Kron *et al.*, 1994).

#### **Pseudohyfální buňky mají buněčný cyklus bez G1 fáze.**

Pseudohyfální buňky rostou v době mezi objevením se pupenu (poté, co buňka prošla fází startu na rozhraní G1 a S fáze buněčného cyklu) a tvorbou septa, což představuje asi 85 % trvání buněčného cyklu. Lineární růst se pak na krátkou chvíli zastavuje. V této klidové fázi dochází k vytvoření septa a k iniciaci tvorby dceřiného pupenu. Interval mezi vytvořením septa a objevením se pupenu představuje pouze 5 - 10 % dceřiného buněčného cyklu. Je tedy zřejmé, že v buněčném cyklu pseudohyfálních buněk je výrazně potlačena fáze růstu bez pučení, tj. fáze G1.

Absence G1 fáze u buněk pseudohyfálního typu se potvrdila také při zjišťování množství DNA v buňkách. Většina kvasinkových buněk nemá při nedostatku živin zdvojenou DNA, nachází se v G1 fázi. Naopak většina pseudohyfálních buněk je ve fázi po DNA syntéze; je tedy v G2 fázi (Kron *et al.*, 1994).

#### **Kontrola velikosti buňky se odehrává na rozhraní G2 a M fáze.**

Další experimenty ukázaly, že se kvasinkové a pseudohyfální buňky chovají odlišně při snížení rychlosti růstu. Zpomalení růstu kvasinkových forem buněk působením cykloheximidu vedlo k prodloužení doby, kterou musí malé dceřiné buňky strávit v G1 fázi. Také u pseudohyfálních buněk dochází vlivem cykloheximidu ke zpomalení růstu. Toto zpomalení ale nemá vliv na synchronizaci pučení mateřské a dceřiné buňky. Dělení zůstává symetrické. U těchto buněk je důsledkem přítomnosti cykloheximidu prodloužení času stráveného v G2 fázi. Kontrolní bod pseudohyfálních buněk se tedy nachází na rozhraní G2 a M fáze (Kron *et al.*, 1994).

Z uvedených charakteristik pseudohyfálních buněk plyne, že jejich buněčný cyklus vykazuje řadu znaků svědčících o podobnosti s buněčným cyklem kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*.

### **3.1.3 FLOKULINY**

---

Jedním z nezbytných předpokladů filamentárního růstu je přítomnost adhezivní molekuly, flokulinu Flo11p (případně Flo10p) na povrchu buněk. Následující kapitola přináší stručný přehled flokulinů vyskytujících se u kvasinky *S. cerevisiae* a také přehled fenotypů závislých na přítomnosti flokulinů v buňkách.

Flokuliny (rodina Flo proteinů) patří mezi kvasinkové adheziny. Flokuliny jsou specifické proteiny buněčné stěny kvasinky *S. cerevisiae* zajišťující adhezi buněk k agaru, pevným povrchům či jiným buňkám; jsou příbuzné adhezínům patogenních kvasinek. U *S. cerevisiae* bylo popsáno 5 flokulinů, a to Flo1p, Flo5p, Flo9p, Flo10p a Flo11p (přehledové články Dranginis *et al.*, 2007; Soares, 2011).

Jednou větví Flo rodiny jsou flokuliny Flo1p, Flo5p, Flo9p a Flo10p, kódující specifické povrchové proteiny, které mají na N-konci lektinům podobnou vazebnou doménu, pomocí které se vážou na manózoové zbytky na povrchu ostatních buněk. Tato vazba je závislá na přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a umožňuje flokulaci buněk, tj. asexuální spojování buněk do shluků provázené sedimentací těchto shluků v tekutém médiu (Stratford, 1988). Přidání určitých cukrů



k buňkám kompetitivně inhibuje adhezi, a je tak snadným způsobem, jak určit, na který sacharid se daný adhezín váže. Rozlišujeme dva flokulační fenotypy (Stratford a Assinder, 1991). Jednak flokulaci typu Flo1, kdy flokulace probíhá během růstu a je inhibována manózou. Do této skupiny patří flokuliny Flo1p a Flo5p. Druhý typ je tzv. NewFlo, kdy flokulace probíhá až po skončení fermentace a je inhibována manózou, glukózou, maltózou a sacharózou (ale ne galaktózou). Mezi flokuliny NewFlo patří homolog flokulinu Flo1p, Lg-Flo1p (Kobayashi *et al.*, 1998). Geny kódující flokuliny Flo1p, Flo5p, Flo9p a Flo10p vykazují značnou sekvenční homologii a nacházejí se v blízkosti telomer (přibližně 10 - 40 kb od telomer), tedy v oblasti náchylnější k rekombinacím (Teunissen a Steensma, 1995).

Do druhé větve Flo rodiny patří flokulin Flo11p. V tomto případě adheze není závislá na sacharidech. *FLO11* jako jediný z genů kódujících flokuliny není subtelomerický (Lo a Dranginis, 1996). Flo11p je zodpovědný za flokulaci, filamentární růst a další fenotypy (viz následující kapitola).

Všechny flokuliny jsou glykoproteiny s obdobnou třídoménovou strukturou. Hydrofobní C-koncová doména obsahuje signál pro připojení GPI-kotvy, která je nezbytná pro ukotvení adhezínu v buněčné stěně (Watari *et al.*, 1994). Součástí hydrofobní N-koncové domény je signální sekvence, navádějící protein do sekreční dráhy. Po odštěpení signální sekvence N-koncová doména vyčnívá nad buněčný povrch a umožňuje vazbu na sacharidy a peptidy na povrchu dalších buněk (Kobayashi *et al.*, 1998). Pro centrální doménu adhezínu je typická přítomnost repetitivních elementů bohatých na serin a threonin kódovaných konzervovanými DNA sekvencemi, které jsou příčinou častých rekombinací. Centrální doména je silně glykosylovaná a prostřednictvím hydrofilních a hydrofobních interakcí patrně zajišťuje adhezi k abiotickým povrchům (Rando a Verstrepen, 2007).

Variabilita povrchových flokulinů je dána jednak variabilitou počtu tandemových repetící v centrální doméně flokulinu. Více repetící znamená silnější adhezi (Rando a Verstrepen, 2007). Variabilitu rovněž zajišťuje možnost produkovat různé flokuliny. V jedné buňce se může exprimovat pouze jeden *FLO* gen (Verstrepen *et al.*, 2009) a ten podléhá epigenetické regulaci. V důsledku toho můžeme v jedné monokolonii (klon buněk vytvořený z jedné buňky) nalézt buňky s odlišnou expresí *FLO* genů. Některé buňky exprimují *FLO11*, některé mají *FLO11* umlčený. Jiné buňky ve stejné kolonii zase exprimují *FLO10* (díky genu *IRA2* s vysokou frekvencí mutací), jiné mají *FLO10* umlčený. Další buňky vůbec neadherují, tj. neexprimují ani *FLO11* ani *FLO10* (Halme *et al.*, 2004).

Variabilita povrchových flokulinů *S. cerevisiae* připomíná variabilitu povrchových adhezínů patogenních kvasinek (*Candida albicans*, *Candida glabrata*) nebo dokonce prvoků (Verstrepen *et al.*, 2009), která je nezbytná pro přežití těchto patogenů v savčích buňkách.

Flokuliny a další adheziny jsou nezbytné pro flokulaci (flokuliny Flo1p, Flo5p, Flo9p, Flo10p a Flo11p), pro filamentární růst (Flo11p) a křížení (adheziny Fig2p, Aga1p a Sag1p). Přestože se jedná o velice specifické procesy, vyžadující rozdílné kultivační podmínky, signální dráhy či buněčné struktury, bylo zjištěno, že se výše popsané flokuliny a adheziny mohou, pokud jsou nadprodukovány, ve svých funkcích vzájemně zastupovat. Například nadprodukovaný Flo11p nebo nadprodukovaný Fig2p se mohou uplatnit při křížení, invazivním růstu, filamentárním růstu i při flokulaci. Obnovit invazivní růst u *flo11* haploidního kmene a u *flo11/flo11* diploidního kmene může nadprodukce Fig2p nebo Flo10p, ne ovšem nadprodukce Flo1p. Nadprodukovaný Flo11p a nadprodukovaný Flo10p mohou zastoupit funkci adhezínů specifických pro křížení, tj. Fig2p, Aga1p a Sag1p (Guo *et al.*, 2000).

### 3.1.3.1 Flokulin Flo11p

Gen *FLO11* identifikovali Lo a Dranginis (1996), jako gen, který kóduje protein lokalizovaný v buněčné stěně a je nezbytný pro flokulaci buněk u kmene *S. cerevisiae* var. *diastaticus* na konci fermentace (kmen netvořící pseudohyfy). V tomtéž roce popsali stejný gen u kmenů *S. cerevisiae* sekretujících amylázu také Lambrechts *et al.* (1996) a pojmenovali ho *MUC1*. U diploidních kmenů pozorovali pseudohyfy, u haploidních kmenů invazivní růst, a to při kultivaci na médiu se škrobem nebo maltotriózou jako jediným zdrojem uhlíku (a s bohatým zdrojem dusíku). Lo a Dranginis později publikovali zjištění, že u kmenů s genetickým pozadím  $\Sigma 1278b$  je gen *FLO11* (*MUC1*) nezbytný pro tvorbu pseudohyf u diploidních kmenů při dusíkovém hladovění a pro invazivní růst haploidních kmenů na bohatém médiu. Diploidní kmeny s  $\Delta flo11$  mutací netvořily pseudohyfy a u haploidních kmenů s  $\Delta flo11$  mutací nedocházelo k invazivnímu růstu do agaru (Lo a Dranginis, 1998).

Dalšími fenotypy, které jsou spojené s expresí *FLO11*, jsou tvorba flóru (povlak na povrchu zrajícího cherry vína; Ishigami *et al.*, 2006), adheze k plastu a tvorba „matů“ (komplexní struktury podobné koloniím vznikající na nedostatečně ztuženém agarovém médiu; Reynolds a Fink 2001) a také tvorba biofilmu (Purevdorj-Gage *et al.*, 2007). Bylo prokázáno, že adhezivita kmenů k agaru a invazivita klesá s rostoucí ploidií kmene. Důvodem je pokles exprese genu *FLO11* úměrně rostoucí ploidii. Nadprodukce *FLO11* může sníženou adhezivitu a invazivitu u víceploidních kmenů obnovit (Galitski *et al.*, 1999).

Pseudohyfální růst, invazivní růst, tvorba matů a biofilmů jsou fenotypy studované nejčastěji na kmenech *S. cerevisiae* odvozených od  $\Sigma 1278b$ . V těchto kmenech je z *FLO* genů exprimován pouze *FLO11*, neboť ostatní *FLO* geny ležící v blízkosti telomer jsou umlčené (Guo *et al.*, 2000).

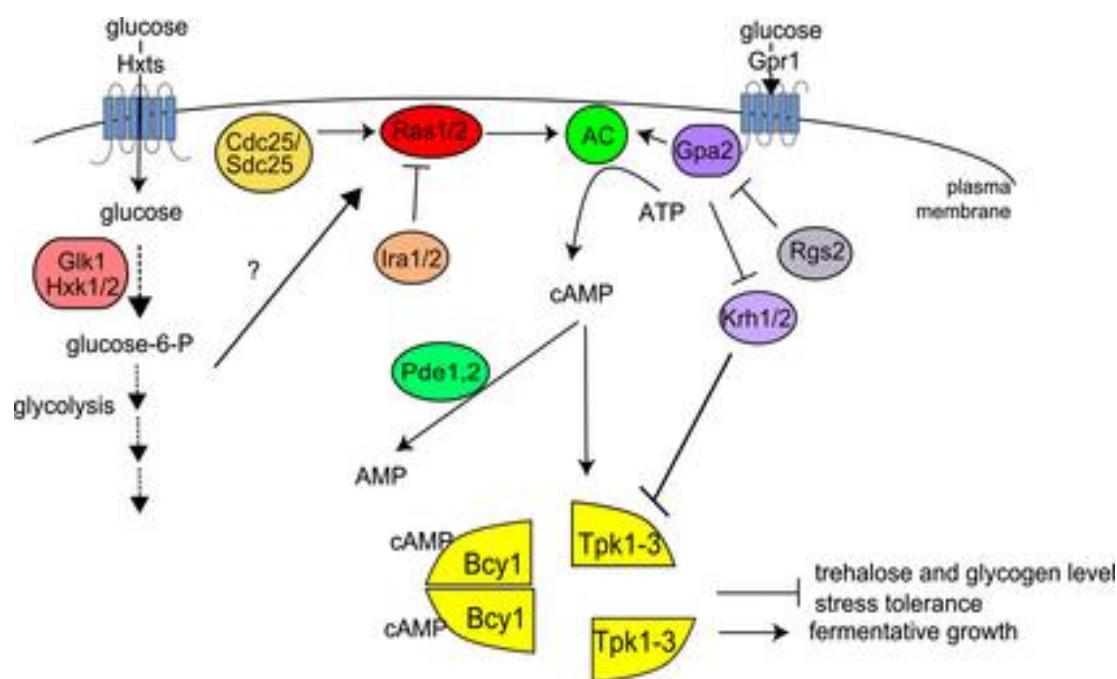
Lokalizace flokulinu Flo11p v rámci buňky není u všech buněk tvořících filamenta stejná. Flokulin se někdy vyskytuje na celém povrchu buněk, někdy pouze na růstovém vrcholu filamenta. Polarizovaná lokalizace patrně přispívá k udržení spojení mezi mateřskou a dceřinou buňkou, výskyt na celém povrchu zase ovlivňuje adhezi buněk k pevným povrchům i adhezi mezibuněčnou (Guo *et al.*, 2000).

### 3.1.4 METABOLICKÉ DRÁHY A GENY PODÍLEJÍCÍ SE NA REGULACI FILAMENTÁRNÍHO RŮSTU

Regulace filamentárního růstu je velmi složitá. Podílí se na ní více než 500 genů (Shively *et al.*, 2013) a mnoho signálních drah včetně několika významných evolučně konzervovaných signálních drah: RAS/PKA (*rat sarcoma/protein kinase A*) dráha, MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) dráha, SNF1 (*sucrose nonfermentable*) dráha a TOR (*target of rapamycin*) dráha.

#### 3.1.4.1 RAS/PKA signální dráha

Důležitým stimulem, který spouští filamentární růst je nedostatek glukózy. Na přítomnost glukózy a sacharózy v médiu reaguje RAS/PKA dráha (obr. 3.9) a ta následně ovlivňuje filamentární růst (Gagiano *et al.*, 2002). Kromě filamentárního růstu ovlivňuje tato dráha například také normální buněčný růst, metabolismus glukózy, odolnost vůči stresu (včetně metabolismu trehalózy) a flokulaci (přehledový článek Broach 2012).



**Obr. 3.9.** RAS/PKA dráha. AC – adenylátcykláza, (Upraveno podle Conrad *et al.*, 2014).

RAS/PKA dráha je aktivována dvěma nezávislými způsoby. Prvním je zvýšení aktivity adenylátcyklázy Cyr1p v důsledku intracelulární fosforylace glukózy. Druhým je zvýšení aktivity Cyr1p prostřednictvím GPCR (*G* *protein-coupled receptor*) systému, který je tvořený receptorem Gpr1p a proteinem Gpa2p ( $\alpha$  podjednotka GTP-vazebného proteinu) a který monitoruje přítomnost extracelulární glukózy a sacharózy (přehledový článek Conrad *et al.*, 2014).

Při prvním způsobu aktivace se uplatňuje GTPáza Ras2p, která v aktivované formě (s navázaným GTP) aktivuje adenylátcyklázu Cyr1p, což vede ke zvýšení hladiny intracelulárního cAMP (přehledový článek Conrad *et al.*, 2014). Dominantní bodová mutace *RAS2<sup>val19</sup>* vede ke konstitutivní aktivaci RAS/PKA dráhy (Kataoka *et al.*, 1984). Fenotypovým projevem této mutace je proliferace i za neadekvátních výživových podmínek. Při testování diploidních kmenů *S. cerevisiae* nesoucích plazmid s genem *RAS2<sup>val19</sup>* na médiu s prolinem nebo nízkým obsahem amoniaku byl zjištěn zesílený pseudohyfální růst (Gimeno *et al.*, 1992).

Mutace v genech *RAS2* nebo *CDC25* (GEF, *guanosine exchange factor*; aktivuje Ras2p navázáním GTP) vedou k defektu filamentárního růstu, zatímco mutace genu *IRA2* nebo *IRA1* (GAP, *GTPase-activating protein*; stimulují hydrolýzu GTP a inaktivují Ras2p) filamentární fenotyp zesiluje (Halme *et al.*, 2004; viz kapitola 3.1.5).

Ke zvýšení aktivity Cyr1p a ke zvýšení koncentrace cAMP dochází rovněž při aktivaci Gpr1p/Gpa2p (GPCR) komplexu (přehledový článek Conrad *et al.*, 2014). Gpr1p funguje jako senzor sacharidů (glukózy a sacharózy) a ne jako transportér sacharidů (Kraakman *et al.*, 1999). Receptor Gpr1p je transkripčně aktivován také během dusíkového hladovění. Deleční mutanty *gpr1* mají defekt produkce cAMP a nevykazují filamentární fenotyp (Lorenz *et al.*, 2000b).

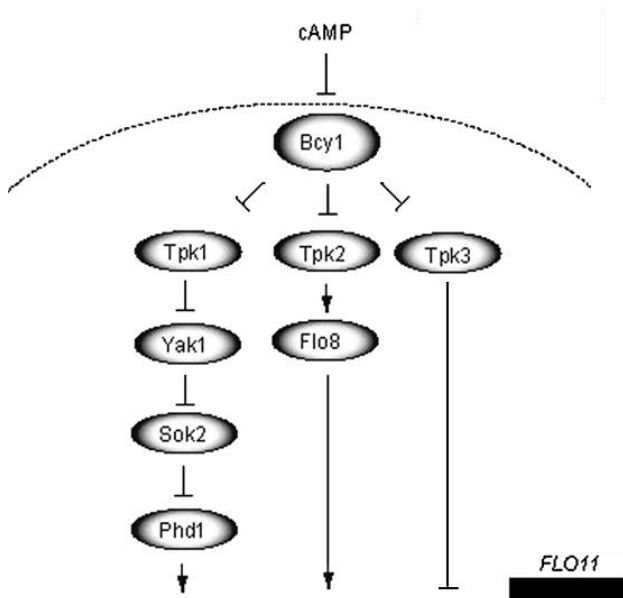
Gen *GPA2* kóduje  $\alpha$  podjednotku heterotrimerního GTP-vazebného proteinu. Bylo prokázáno, že se *GPA2* podílí na regulaci pseudohyfální diferenciace (Kübler *et al.*, 1997; Lorenz a Heitman 1997). Mutanty  $\Delta gpa2/\Delta gpa2$  mají poruchu pseudohyfálního růstu. Dominantně negativní alela *GPA2* (*GPA2<sup>gly299ala</sup>*) inhibuje filamentární růst rodičovských kmenů. Naopak přítomnost konstitutivně aktivované alely *GPA2* (*GPA2<sup>gly132val</sup>*) filamentární růst stimuluje, a to dokonce i na médiích bohatých na dusík. Nenavodí však filamentární růst v haploidních buňkách.

Při regulaci pseudohyfálního růstu kvasinek je zásadní hladina cAMP (Mösch *et al.*, 1996). Nadprodukce cAMP fosfodiesterázy (Pde2p), která štěpí a inaktivuje cAMP, inhibuje pseudohyfální růst a blokuje zesílený pseudohyfální růst vyvolaný mutací *RAS2<sup>val19</sup>* (Ward *et al.*, 1995). Naopak dodání exogenního cAMP do média s chudým zdrojem dusíku stimuluje filamentární růst u  $\Delta pde2/\Delta pde2$  mutantních kmenů. Vyšší dávky cAMP pak, i u kmenů s funkčním genem *PDE2*, vedou k zesílenému pseudohyfálnímu růstu a dokonce také k pseudohyfální diferenciaci na médiu s bohatým zdrojem dusíku (Lorenz a Heitman, 1997).

cAMP reguluje aktivitu proteinkinázy A (PKA). cAMP se váže na její regulační podjednotku Bcy1p, což vede k disociaci katalytických podjednotek Tpk(1-3), a tím k aktivaci jejich kinázové aktivity (Toda *et al.*, 1987a,b). Tři Tpk(1-3) podjednotky proteinkinázy A regulují gen *FLO11*, který má zásadní roli při pseudohyfálním růstu. Role Tpk podjednotek jsou však odlišné.

Tpk2p působí jako aktivátor *FLO11* (obr. 3.10). Delece genu *TPK2* vede ke ztrátě filamentárního růstu. Tpk2p podjednotka aktivuje transkripční faktor Flo8p a inaktivuje transkripční faktor Sfl1p (Robertson a Fink, 1998). Flo8p i Sfl1p regulují expresi flokulinu Flo11p, který je nezbytný pro filamentární růst. Flo8p i Sfl1p mají vazebné místo ve stejné oblasti promotoru *FLO11* (Pan a Heitman, 2002). Flo8p stimuluje expresi *FLO11*, a tím indukuje filamentární růst (Pan a Heitman, 1999). Sfl1p naopak inhibuje expresi *FLO11* a inhibuje filamentární růst (Robertson a Fink, 1998). Flo8p a Sfl1p se podílejí na epigenetické regulaci exprese *FLO11* (viz kapitola 3.1.5).

Podjednotka Tpk3p působí jako inhibitor exprese genu *FLO11* (obr. 3.10). Delece genu *TPK3* vede k zesílení filamentárního růstu (Robertson a Fink, 1998). Údaje o vlivu podjednotky Tpk1p jsou různé. Podle některých publikací delece genu *TPK1* filamentární růst neovlivňuje (Robertson a Fink, 1998). Podle jiných autorů delece *TPK1* vede k filamentárnímu růstu a podjednotka Tpk1p tedy tvorbu filament inhibuje (Pan a Heitman, 1999). Podle novější práce Tpk1p inhibuje expresi flokulinu Flo11p prostřednictvím dráhy YAK1 (Malcher *et al.*, 2011; obr. 3.10).



**Obr. 3.10.** Podjednotka Tpk1p inhibuje expresi genu *FLO11*. Podjednotka Tpk2p aktivuje expresi *FLO11*. (Upraveno podle Cullen *et al.*, 2012).

Mezi dvěma větvemi RAS/PKA dráhy (větev s Gpr1p/Gpa2p komplexem a větev s Ras2p) byla nalezena další propojení.  $\beta$  podjednotka Gpb1/2p tvořící komplex s  $\alpha$  podjednotkou Gpa2p pozitivně reguluje protein Ira1/2p, což vede k inhibici GTPázy Ras2p (Harashima *et al.*, 2006). Gpb1/2p se patrně váže na Ira1/2p a stabilizuje ho (Harashima *et al.*, 2006). Podle jiné

práce naopak Gpb1p inhibuje Ira2p tím, že ho označí k degradaci (ubiquitinace; Phan *et al.*, 2010).

Signálem, který se podílí na regulaci RAS/PKA dráhy, jsou kromě glukózy také amonné ionty, jejichž dostupnost je monitorována vysokoafinitní permeázou amonných iontů Mep2p, která je nezbytná pro filamentární růst (Lorenz a Heitman, 1998a,b; Van Nuland *et al.*, 2006). RAS/PKA dráha se tak pravděpodobně podílí na stimulaci *FLO11* při dusíkovém hladovění. Kromě toho je tato dráha patrně součástí *quorum sensing* signální dráhy, protože aromatické alkoholy tryptofol a fenylalkohol stimulují expresi *FLO11* prostřednictvím Tpk2p (Chen a Fink, 2006; viz kapitola 3.1.1.6). RAS/PKA dráha je významně propojena s FG MAPK dráhou (viz kapitola 3.1.4.7).

#### 3.1.4.2 YAK1 dráha

Součástí RAS/PKA dráhy je dráha YAK1. Kináza Yak1p, která v aktivní nefosforylované formě pozitivně reguluje filamentární růst prostřednictvím transkripčních faktorů Sok2p a Phd1p (obr. 3.10), je regulována Tpk1p podjednotkou proteinkinázy A, která ji inaktivuje fosforylací (Malcher *et al.*, 2011).

Gen *SOK2* kóduje transkripční faktor, který byl objeven jako supresor termosenzitivních mutantů s defektem PKA (Ward *et al.*, 1995). Sok2p negativně reguluje filamentární růst. Deleční mutanty *sok2* indukují tři transkripční faktory: Phd1p, Ash1p a Swi5p a vykazují zvýšený filamentární růst (Pan a Heitman, 2000). Gen *PHD1* identifikovali už Gimeno a Fink (1994) jako gen, jehož amplifikace v diploidních buňkách rostoucích na médiu s nedostatkem dusíku způsobí intenzivní pseudohyfální růst. Gen *PHD1* je paralogem genu *SOK2* (Byrne a Wolfe, 2005).

Swi5p aktivuje expresi *FLO11* nepřímo, prostřednictvím Ash1p (Pan a Heitman, 2000). Ash1p je transkripční faktor, represor transkripce HO endonukleázy a tedy represor přepínání párovacího typu u haploidních dceřiných buněk (Sil a Herskowitz, 1996). Mutace *ash1* vede ke snížení exprese *FLO11* a k defektu pseudohyfálního růstu (Pan a Heitman, 2000).

Swi5p má ještě další úlohu při regulaci pseudohyfálního růstu, tentokrát však inhibiční. Je totiž nezbytný pro expresi genů *EGT2* a *CTS1* (kódujících endoglukanázu a endochitinázu), které jsou potřebné pro separaci buněk po cytokinezi. Mutace *swi5* tedy zesiluje pseudohyfální růst tím, že brání separaci mateřských a dceřiných buněk (Pan a Heitman, 2000).

#### 3.1.4.3 Dráha SNF1 - dráha glukózové represe

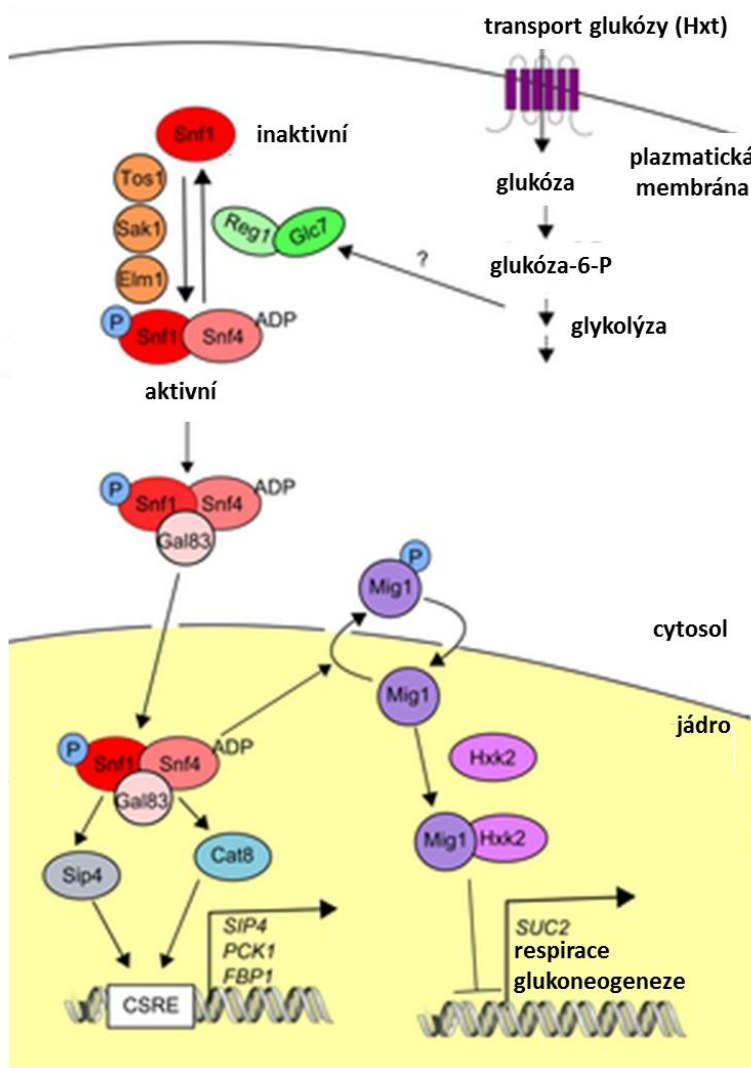
Při regulaci filamentárního růstu se uplatňuje rovněž dráha SNF1 (Kuchin *et al.*, 2002; obr. 3.11), která je stejně jako RAS/PKA dráha regulována koncentrací glukózy. Ale na rozdíl od RAS/PKA dráhy je aktivována při snižující se koncentraci glukózy; umožňuje buňkám adaptovat se na nedostatek glukózy a využívat jiné zdroje uhlíku.

Proteinkináza Snf1p při nízké koncentraci glukózy indukuje respirativní metabolismus, akumulaci glykogenu, glukoneogenezi, autofagii, glyoxylátový cyklus, biogenezi peroxisomů a stárnutí. Rovněž reguluje acetylaci histonů, zvyšuje odolnost vůči stresu, reprimuje biosyntézu mastných kyselin (inaktivuje acetyl-CoA karboxylázu a některé transkripční faktory), reprimuje biosyntézu aminokyselin (inaktivuje transkripční faktor Gcn4p; přehledový článek Conrad *et al.*, 2014). Tato dráha při nízké koncentraci glukózy indukuje filamentární růst (Palecek *et al.*, 2002), tvorbu biofilmů a „matů“ (kolonie rostoucí na řídkém agaru; Reynolds *et al.*, 2008) a expresi genu *FLO11* (Kuchin *et al.*, 2002).

Snf1p je heterotrimerní protein. Katalytická podjednotka Snf1p tvoří komplex s jednou  $\beta$ -podjednotkou (Gal83p, Sip1p nebo Sip2p) a s aktivační  $\gamma$ -podjednotkou Snf4p, která brání autoinhibici Snf1p při glukózovém hladovění. Různé komplexy Snf1p jsou aktivovány kinázami Elm1p, Sak1p a Tos3p a jsou inaktivovány fosfatázou Reg1p/Glc7p (obr. 3.11; přehledový článek Conrad *et al.*, 2014).

Jedním z cílů proteinkinázy Snf1p je transkripční represor Mig1p. Při nedostatku glukózy Snf1p fosforyluje Mig1p. Tím Mig1p ztrácí represorovou funkci a je přemístěn z jádra do cytoplazmy. Mig2p je funkční homolog Mig1p, ale není regulován Snf1p. Při dostatku glukózy Mig1p a Mig2p reprimují expresi genů pro metabolismus alternativních zdrojů uhlíku; částečně díky Mig1p-dependentní vazbě korepresoru Tup1p/Cyc8p (přehledový článek Conrad *et al.*, 2014). Karunanithi a Cullen (2012) prokázali, že se Mig1p a Mig2p podílejí rovněž na regulaci filamentárního růstu při glukózovém hladovění. Při dostatku glukózy Mig1p inhibuje expresi genu *FLO11*. Jiní autoři (Kuchin *et al.*, 2002; Vyas *et al.*, 2003) popsali další způsob regulace filamentárního růstu pomocí Snf1p. Při nedostatku glukózy komplex Snf1p/Gal83p inaktivuje proteiny Nrg1p a Nrg2p, což jsou transkripční represory genu *FLO11*. Nrg1p a Nrg2p jsou zároveň pod kontrolou dráhy RIM101 (viz kapitola 3.1.4.6).

Při dostatku glukózy, kdy je Snf1p inaktivován, je tedy exprese *FLO11* inhibována, a to díky vazbě regulačních proteinů Mig1p a Nrg1p na promotor *FLO11*. Na této inhibici se podílí také pleiotropní korepresor Tup1p/Cyc8p (Karunanithi a Cullen, 2012). Výsledkem těchto regulací je inhibice filamentárního růstu.

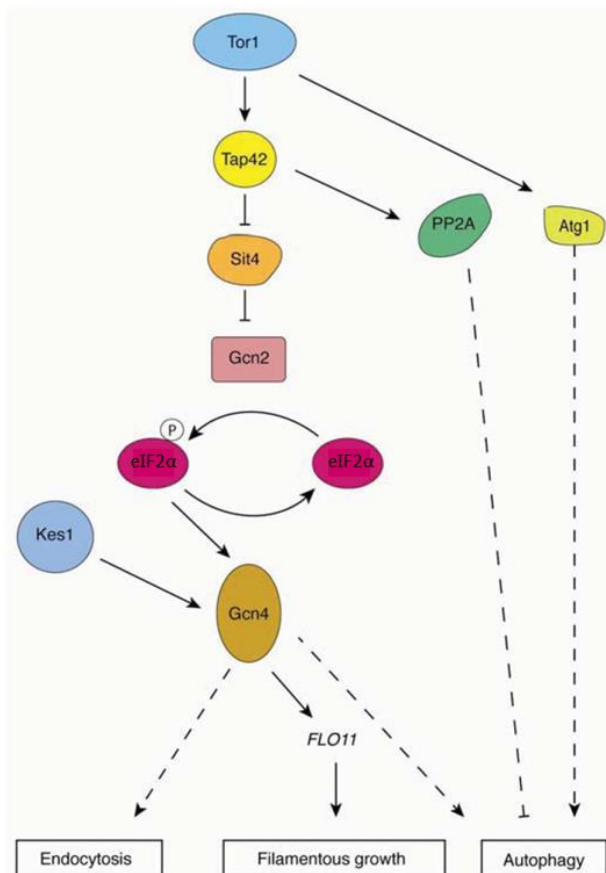


**Obr. 3.11.** Dráha glukózové represe (SNF1 dráha) – úsek regulovaný komplexem Snf1/Gal83/Snf4. (Upraveno podle Conrad *et al.*, 2014).

### 3.1.4.4 TOR dráha

Informace o dostupnosti zdrojů dusíku zpracovává především TOR dráha (Crespo *et al.*, 2002). TOR dráha je inhibována antibiotikem rapamycinem, které se váže na TORC1 (TOR komplex 1 tvořený proteinkinázou Tor1p nebo Tor2p a proteiny Kog1p, Lst8p a Tco89p) a inhibuje ho (přehledový článek Conrad *et al.*, 2014). Inaktivace TORC1 ovlivní například syntézu proteinů, biogenezi ribozomů, transkripci, buněčný cyklus, meiózu, endocytózu, autofágii. Cutler *et al.* (2001) prokázali, že rapamycin také inhibuje pseudohyální růst *S. cerevisiae* při dusíkovém hladovění.

TOR dráha ovlivňuje filamentární růst při dusíkovém hladovění různými způsoby. Jednak reguluje transkripci genu *FLO11* prostřednictvím transkripčního faktoru Gcn4p (transkripční aktivátor genů pro biosyntézu aminokyselin). Bylo prokázáno, že exprese *FLO11-LacZ* byla u kmenů s delecí *gcn4* významně snížena. Naopak zvýšená exprese *GCN4* vedla ke zvýšené expresi *FLO11-LacZ* a k indukci filamentárního růstu. Gcn4p společně s proteinkinázou Gcn2p indukuje filamentární růst a expresi *FLO11* při nedostatku aminokyselin (Braus *et al.*, 2003). V dráze regulující Gcn4p se uplatňují fosfatázy Tap42p a Sit4p (obr. 3.12; přehledový článek Song a Kumar, 2012). Nadprodukce Tap42p obnovuje filamentární růst u buněk ošetřených rapamycinem. Delece fosfatázy Sit4p vede k oslabení filamentárního růstu a ke zvýšení citlivosti na rapamycin. Regulace filamentárního růstu prostřednictvím TOR dráhy je nezávislá na RAS/PKA a FG MAPK drahách (Cutler *et al.*, 2001).



**Obr. 3.12.** Část dráhy TORC1 regulující filamentární růst, endocytózu a autofágii. Přerušované čáry naznačují účinek dalších neuvedených proteinů. eIF2 $\alpha$  - eukaryotický iniciační transkripční faktor 2 $\alpha$ ; PP2A - Ser/Thr fosfatáza typu 2A. (Převzato ze Song a Kumar, 2012).

Kromě fosfatázy Tap2p je cílem působení komplexu TORC1 také proteinkináza Npr1p. Při dusíkovém hladovění, kdy je TORC1 inaktivní, je Npr1p aktivována defosforylací a brání degradaci nespecifické permeázy aminokyselin Gap1p přítomné v plazmatické membráně nebo v sekreční dráze (přehledový článek Conrad *et al.*, 2014). Proteinkináza Npr1p působí také jako pozitivní regulátor proteinů Mep (viz kapitola 3.1.4.5). Vzhledem k tomu, že je potřebná pro transport amonných iontů prostřednictvím transportéru Mep2p, je nezbytná pro pseudohyální růst indukovaný amonnými ionty (Boeckstaens *et al.*, 2007).

TOR dráha také kontroluje NCR dráhu regulující expresi genů, které podléhají dusíkové katabolické represi. V přítomnosti preferovaných zdrojů dusíku je komplex TORC1 aktivní a fosforyluje fosfatázu Tap42p. Důsledkem je inhibice několika fosfatáz (např. Sit4p). V důsledku toho zůstávají transkripční regulátory Gat1p a Ure2p/Gln3p silně fosforylované a nemohou vstoupit do jádra a aktivovat expresi genů, které jsou nutné pro příjem a katabolismus méně preferovaných dusíkatých živin. Pokud jsou dostupné pouze nepreferované zdroje dusíku, je komplex TORC1 neaktivní a regulátory Ure2p, Gln3p a Gat1p jsou částečně defosforylovány. Regulátory potom vstupují do jádra a aktivují geny nezbytné pro využití méně preferovaných dusíkatých živin (přehledový článek Conrad *et al.*, 2014). Bylo zjištěno, že Ure2p a Gln3p pozitivně regulují filamentární růst při dusíkovém hladovění (Lorenz a Heitman, 1998a,b).

#### 3.1.4.5 Mep2p

Už úvodní studie filamentárního růstu ukázaly, že mutanty s poruchou transportu amonných iontů tvoří pseudohyfy ve zvýšené míře (Gimeno *et al.*, 1992). Později Lorenz a Heitman (1998a) zjistili, že vysokoafinitní transportér amonných iontů Mep2p (na rozdíl od nízkoafinitních transportérů Mep1p a Mep3p) je nezbytný pro filamentární růst. U buněk s mutací  $\Delta mep2$ , rostoucích v tekutém médiu s nízkou koncentrací amonných iontů, nebyl zaznamenán defekt v růstu biomasy ani v příjmu amonných iontů. Diploidní kmen  $\Delta mep2/\Delta mep2$  však nebyl schopen filamentárního růstu. Oproti tomu na médiích s limitními koncentracemi glutaminu, prolinu, asparaginu nebo argininu pseudohyfy tvořil. Tento experiment ukázal, že úloha permeázy Mep2p při regulaci filamentárního růstu spočívá v tom, že funguje jako senzor dostupnosti amonných iontů v prostředí (Lorenz a Heitman, 1998a).

Funkce Mep2p jako senzoru je patrně propojena s FG MAPK dráhou (Rutherford *et al.* 2008), RAS/PKA dráhou (Van Nuland *et al.*, 2006) a TOR dráhou (Boeckstaens *et al.*, 2007).

#### 3.1.4.6 Signální dráha RIM101

Na regulaci exprese *FLO11* a regulaci invazivního růstu se podílí rovněž transkripční faktor Rim101p (Rim1p), který je součástí signální dráhy RIM101. Tato dráha je aktivována při neutrálním a alkalickém pH prostředí (obr. 3.13).

Na počátku dráhy RIM101 je receptor Rim21p lokalizovaný na plazmatické membráně, který interaguje s transmembránovým proteinem Dfg16p a Rim9p. Společně vytvářejí komplex detekující neutrální nebo alkalické pH v prostředí. Tento extracelulární signál vede k ubiquitinaci Rim8p a k následné endocytóze Rim8p společně s Dfg16p a Rim21p. Rim8p v membráně endozómu interaguje s proteiny ESCRT komplexů, které jsou nutné pro třídění a

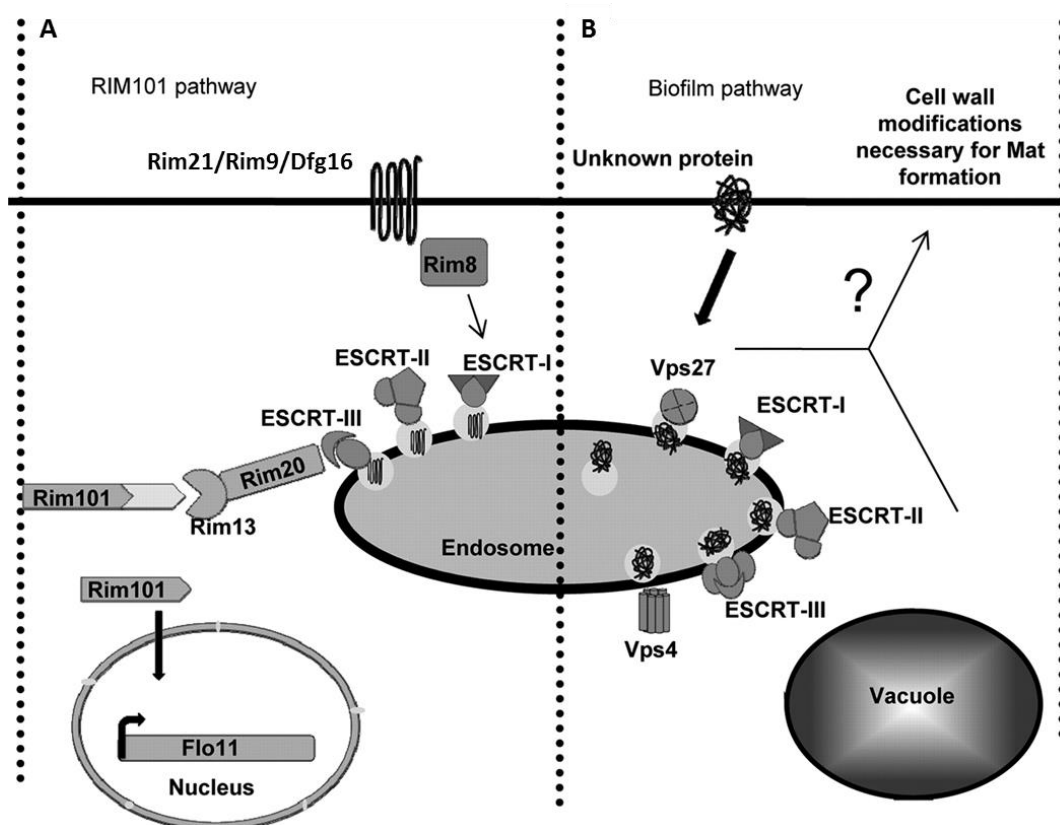


transport proteinů do endozómů. Jeden z proteinů komplexu ESCRT-III umožňuje vazbu proteázy Rim13p prostřednictvím *scaffold* proteinu Rim20p. Rim20p interaguje rovněž s C-koncem transkripčního represoru Rim101p. Rim13p aktivuje Rim101p tím, že odštěpí jeho C-koncovou inhibiční doménu (přehledový článek Selvig a Alspaugh, 2011; Sarode *et al.*, 2011)

Rim101p kontroluje invazivní růst, neboť nižší hladina Rim101p vede k oslabení invazivního růstu (Li a Mitchell, 1997). Rim101p aktivuje gen *FLO11*. Bylo zjištěno, že působí nepřímo tím, že reprimuje expresi genů kódujících transkripční represory *NRG1* (represor *FLO11*) a *SMP1* (Lamb a Mitchell, 2003). Podle dalších pokusů může Rim101p aktivovat gen *FLO11* nejen prostřednictvím *NRG1*, ale i nezávisle na něm (Barrales *et al.*, 2008).

Sarode *et al.* (2011) se zabývali regulací tvorby specifických biofilmů („matů“; viz kapitola 3.1.7) a zjistili, že jejich tvorbu pravděpodobně kontrolují dvě různé dráhy procházející endozómy. První je výše popsaná dráha RIM101. Tato dráha je pro tvorbu „matů“ nezbytná, protože reguluje expresi genu *FLO11*, který je při tvorbě „matů“ vyžadován (obr. 3.13A). Druhá dráha, která je závislá na správné funkci endocytotické MVB (multivezikulární tělísko) dráhy včetně Vps proteinů (obr. 3.13B), rovněž reguluje tvorbu „matů“, ale nezávisle na expresi *FLO11*.

ESCRT proteiny tedy ovlivňují Rim101 dráhu (Xu *et al.*, 2004), a tím invazivní růst a tvorbu „matů“. Mutace v dalších proteinech MVB dráhy (Vps proteiny) ovlivňují pouze tvorbu „matů“, a to nezávisle na Rim101p a Flo11p. Neovlivňují invazivní růst, expresi *FLO11* ani lokalizaci Flo11p (Sarode *et al.*, 2011).

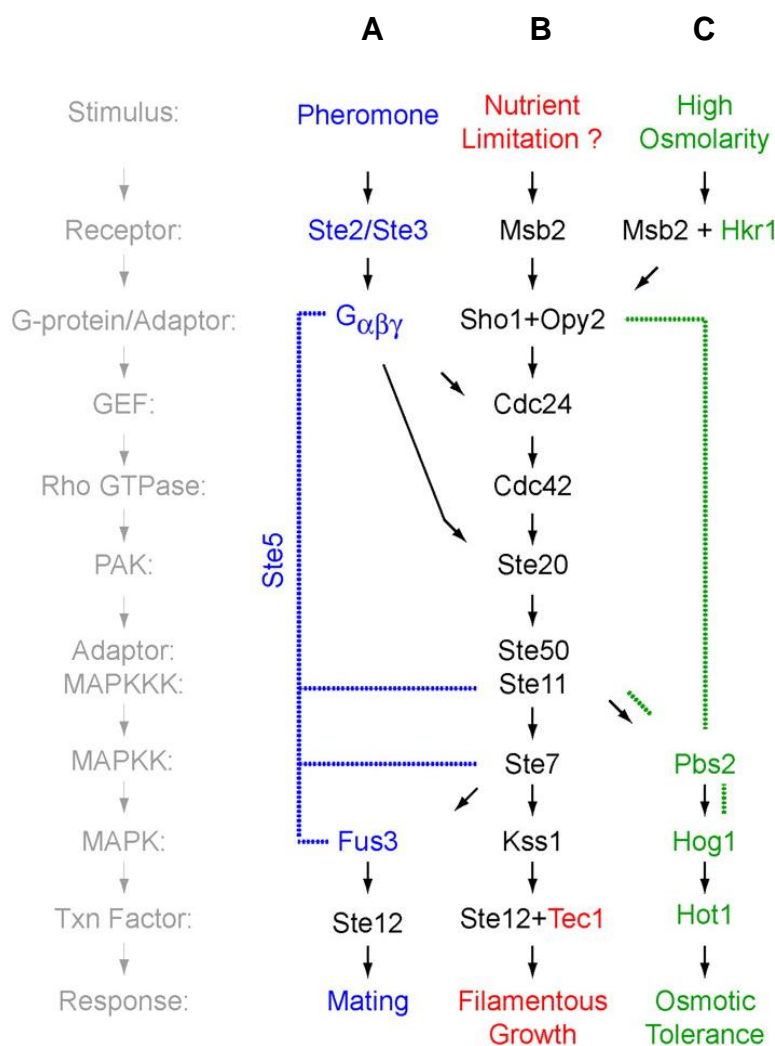


**Obr. 3.13.** A) Signální dráha RIM101 ovlivňuje prostřednictvím Flo11p invazivní růst a tvorbu „matů“. B) Vps proteiny hypotetické MVB dráhy ovlivňují pouze tvorbu „matů“, a to nezávisle na Rim101p a Flo11p. (Upraveno podle Sarode *et al.*, 2011).

### 3.1.4.7 MAPK signální dráhy

MAPK dráhy jsou konzervované dráhy, ve kterých dochází k přenosu signálu prostřednictvím série fosforylací. Kináza MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) je fosforylována a tím aktivována kinázou MAPKK, ta je zase fosforylována kinázou MAPKKK.

U *S. cerevisiae* bylo popsáno 5 různých kináz MAPK (Fus3p, Kss1p, Hog1p, Slt2p (Mpk1p) a Smk1p), které jsou součástí následujících signálních drah a procesů: dráha indukovaná přítomností feromonu uplatňující se při konjugaci (feromonová MAPK dráha), dráha regulující filamentární růst (FG MAPK dráha), HOG (*high osmolarity glycerol response*) dráha odpovídající na vysokou osmolaritu (přehledový článek Saito a Posas, 2012), CWI (*cell wall integrity*) dráha integrity buněčné stěny (přehledový článek Levin, 2011) a sporulace (Krisak *et al.*, 1994). Přestože jsou zmíněné dráhy velmi specifické, některé z nich vzájemně sdílejí některé své důležité komponenty (obr. 3.14).



**Obr. 3.14.** Propojení mezi MAPK signálními drahami. A) Dráha vyžadovaná pro konjugaci (feromonová MAPK). B) Dráha pro filamentární růst (FG MAPK). C) Dráha odpovídající na vysokou osmolaritu (HOG dráha). Proteiny označené barevně jsou specifické pro určitou dráhu, proteiny označené černě figuruji ve více drahách současně. Interakce zprostředkované *scaffold* proteiny jsou vyznačeny tečkovaně. (Převzato z Cullen a Sprague, 2012).

Dráha pro filamentární růst je velkou měrou propojena s feromonovou dráhou, která reaguje na přítomnost feromonu opačného párovacího typu v blízkosti buněk a spouští

protahování buněk (tvorba tzv. *shmoo*) a následnou konjugaci. Feromonová dráha byla intenzivně studována (např. přehledové články Chen a Thorner, 2007; Cullen a Sprague, 2012; obr. 3.14A). Po navázání  $\alpha$  (nebo  $\alpha$ ) feromonu na receptor Ste2p (nebo Ste3p) na povrchu buněk opačného párovacího typu, dojde k uvolnění  $\alpha$  podjednotky (Gpa1p) z heterotrimerního G-proteinu navázaného na plazmatickou membránu. Uvolněné  $\beta\gamma$  podjednotky asociují s proteinkinázou Ste20p a společně pak se *scaffold* proteinem Ste5p umožní lokalizaci MAPKKK (Ste11p), MAPKK (Ste7p) a MAPK (Fus3p) na plazmatické membráně v těsné blízkosti a ve správném pořadí. Cdc42p, GTPáza rodiny Rho, napomáhá vazbě Ste20p na plazmatickou membránu. Ste20p fosforyluje proteinkinázu Ste11p (za přispění proteinu Ste50p). Ste11p fosforyluje proteinkinázu Ste7p a ta fosforyluje proteinkinázu Fus3p nebo (v nepřítomnosti Fus3p) proteinkinázu Kss1p. Fus3p fosforyluje represory Dig1p a Dig2p, čímž pomine inhibice transkripčního faktoru Ste12p. Ste12p se váže do promotorových oblastí genů potřebných pro křížení, například *FUS1* (vazba homodimeru Ste12p) a *KAR3* (vazba heterodimeru Ste12p/Kar4p). Fus1p zajišťuje protahování buněk (tvorba *shmoo*), Kar3p je nezbytný pro buněčnou a jadernou fúzi. Fus3p zároveň zajišťuje zastavení buněčného cyklu v G1 fázi (fosforylací aktivuje Far1p, což je inhibitor cyklin dependentní kinázy).

### MAPK dráha pro filamentární růst (FG MAPK)

Filamentární růst je regulován FG MAPK dráhou (obr. 3.14B). Na indukci pseudohyální dráhy se podílí heterodimerní receptor Sho1p/Msb2p, který patrně monitoruje dostupnost živin, ale zatím není jasné jakým způsobem. Receptor Sho1p/Msb2p přenáší signál na GTPázu Cdc42p, která má roli při polarizovaném růstu, a následně na další komponenty dráhy. Cdc42p je aktivována prostřednictvím Cdc24p (GEF) a následně aktivuje proteinkinázu Ste20p. Dále jsou kaskádovitě aktivovány kinázy Ste11p, Ste7p a Kss1p. Kss1p poté fosforylací inhibuje transkripční represory Dig1p a Dig2p, a tím aktivuje komplex transkripčních faktorů Ste12p/Tec1p (přehledový článek Cullen a Sprague, 2012). Kss1p má při regulaci Ste12p/Tec1p ještě jednu roli: nefosforylovaná Kss1p se váže na Ste12p/Tec1p a inhibuje ho (Cook *et al.*, 1997). Aktivní transkripční faktor Ste12p/Tec1p stimuluje expresi *FLO11* (Borneman *et al.*, 2006).

Aktivace Cdc42p během filamentárního růstu je závislá na přítomnosti aktivovaného proteinu Ras2p (Mösch *et al.*, 1996). Ukázalo se, že Ras2p reguluje FG MAPK dráhu nepřímo, tím že ovlivňuje expresi genu *MSB2*. Rovněž Tpk2p je nezbytný pro expresi *MSB2* (Chavel *et al.*, 2010). Existuje tedy významné propojení mezi RAS/PKA dráhou a FG MAPK dráhou.

Kromě heterodimerního receptoru Sho1/Msb2 je dalším předpokládaným senzorem FG MAPK dráhy Mep2p (Rutherford *et al.* 2008). Mep2p je vysokoafinitní permeáza transportující amonné ionty do kvasinkové buňky, která pravděpodobně funguje i jako senzor registrující nízkou koncentraci amonných iontů (viz kapitola 3.1.4.5; Lorenz a Heitman, 1998a). Dalším mechanismem aktivujícím expresi *FLO11* prostřednictvím FG MAPK dráhy je zvýšená koncentrace určitých *fusel* alkoholů, např. butanolu (Lorenz *et al.*, 2000a; viz kapitola 3.1.1.5)

Mezi signální dráhou pro filamentární růst (FG MAPK) a feromonovou dráhou jsou dva hlavní rozdíly. Pseudohyální dráha není indukována navázáním feromonu, ale dostupností živin, což je monitorováno Ras proteinem a patrně také proteiny Mep2p a Sho1p/Msb2p. Jako transkripční faktor funguje u feromonové dráhy homodimer transkripčního faktoru Ste12p, v případě filamentárního růstu to je heterodimer Ste12p/Tec1p (Madhani *et al.*, 1997).

Přestože obě dráhy sdílejí mnoho důležitých komponent (Cdc24p, Cdc42p, Ste20p, Ste50p, Ste11p, Ste7p, Kss1p, Ste12p a další), jejich specifita je zaručena tím, že aktivace proteinkinázy Fus3p v přítomnosti feromonu vede k degradaci transkripčního faktoru Tec1p potřebného pro pseudohyální růst (Bao *et al.*, 2004). Proteinkináza Kss1p, která je aktivována v obou drahách, pak nemůže aktivovat pseudohyální růst.

#### 3.1.4.8 Transkripční faktory Mss11p a Flo8p

Transkripční regulátor Mss11p hraje ústřední roli při regulaci transkripce genu *FLO11* a tedy i při regulaci pseudohyfálního a invazivního růstu (Gagiano *et al.*, 1999; van Dyk *et al.*, 2005). Mss11p byl poprvé identifikován jako pozitivní regulátor metabolismu škrobu zvyšující aktivitu glukooamyláz, neboť kontroluje expresi genu *STA2* (Webber *et al.*, 1997). Mss11p také indukuje transkripci *FLO1*, a tím flokulaci (Bester *et al.*, 2006). Navíc také reguluje geny kódující manoproteiny buněčné stěny (Bester *et al.*, 2012).

Flo8p podobně jako Mss11p aktivuje transkripci genu *FLO11* a indukuje filamentární růst. (Gagiano *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999). Flo8p byl původně identifikován jako transkripční aktivátor genu *FLO1* kódujícího flokulin, je tedy nezbytný také pro flokulaci (Kobayashi *et al.*, 1999). Kromě toho je důležitý pro expresi genu *STA1*, který kóduje extracelulární glukooamylázu (Kobayashi *et al.*, 1999).

Skutečnost, že geny *MSS11* a *FLO8* mají podobné funkce a jejich mutace vykazují velmi podobné fenotypy, vysvětlilo zjištění, že příslušné proteiny tvoří heterodimer a na regulaci transkripce cílových genů se podílejí společně (Kim *et al.*, 2014). Stejní autoři prokázali u transkripčního faktoru Flo8p doménu pro aktivaci transkripce (C-koncová doména) a doménu zajišťující interakci s Mss11p (LisH motiv na N konci). Zjistili také, že komplex Mss1p a Flo8p fyzicky i funkčně interaguje s komplexem Swi/Snf, který se podílí na remodelaci chromatinu a interaguje s aktivačními doménami některých transkripčních aktivátorů (např. Gcn4p; Côté *et al.*, 1994). Transkripce genů *FLO11*, *FLO1* a *STA1* je tedy aktivována heterodimerem tvořeným proteiny Mss11p a Flo8p interagujícím s komplexem Swi/Snf.

Gen *FLO8* je u mnoha laboratorních kmenů nefunkční. Bylo zjištěno, že kmen S288C, od něhož je velké množství laboratorních kmenů odvozeno, nese mutaci spočívající v záměně jedné báze, která je příčinou vzniku stop kodonu v kódující sekvenci genu *FLO8*. Tato mutace znemožňuje pseudohyfální a invazivní růst u těchto kmenů (Liu *et al.* 1996).

#### 3.1.4.9 Transkripční faktor Rme1p

Při nedostatku živin se buňka musí rozhodnout, zda přepne na filamentární růst (při nedostatku dusíku nebo glukózy) nebo podstoupí meiózu a bude sporulovat (diploidní buňka při nedostatku dusíku a glukózy zároveň) anebo vstoupí do stacionární fáze. Při tomto rozhodování se uplatňuje transkripční faktor Rme1p, který u haploidních kmenů inhibuje meiózu. Rme1p se zároveň váže na promotor *FLO11*, a tím indukuje mezibuněčnou adhezivitu a invazivní růst (u haploidů i diploidů). Rme1p není regulován ani RAS/PKA ani FG MAPK dráhou (van Dyk *et al.*, 2003).

#### 3.1.4.10 Transkripční faktor Opi1p

Transkripční faktor Opi1p, který kontroluje metabolismus inositolu a fosfolipidů (Jiranek *et al.*, 1998), ovlivňuje expresi *FLO11*, tvorbu „matů“ a invazivní růst (Reynolds, 2006). Opi1p interaguje se složkami několika drah, které kontrolují filamentární růst. Proteinkináza A, složka RAS/PKA dráhy, Opi1p fosforyluje, a tím aktivuje (Sreenivas a Carman, 2003). Opi1p reguluje *FLO11* patrně prostřednictvím Nrg2p, represoru SNF1 dráhy (Jesch *et al.*, 2005).

#### 3.1.4.11 SPS systém

Transportéry aminokyselin mají pravděpodobně podobnou funkci jako permeáza amonných iontů Mep2p (Lorenz a Heitman, 1998a); jsou nutné pro transkripci genu *FLO11* a pro fenotypy závislé na Flo11p (tvorba biofilmu, invazivní růst). Torbensen *et al.* (2012) ukázali, že nesespecifická permeáza aminokyselin Gap1p je nezbytná pro invazivní růst. Silná exprese *GAP1* koreluje se zvýšenou intracelulární koncentrací aminokyselin a zvýšenou expresí *FLO11* a dalších *FLO* genů. Exprese *FLO* genů je v tomto případě patrně nezávislá na RAS/PKA dráze. V případě, kdy *GAP1* není exprimován, jsou pro invazivní růst nezbytné geny *GNP1* a *DIP5*, kódující permeázy glutaminu a dalších aminokyselin. Příslušné permeázy Gnp1p a Dip5p indukují expresi *FLO11* pravděpodobně prostřednictvím komponent RAS/PKA dráhy (Torbensen *et al.*, 2012).

Určitou roli při regulaci invazivního růstu hraje také Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p (SPS) systém senzorů extracelulárních aminokyselin. SPS systém indukuje transkripci genů *GNP1*, *DIP5* a *AGP1*, kódujících uvedené permeázy (Klasson *et al.*, 1999). Výsledky Torbensena *et al.* (2012) naznačují, že se SPS systém podílí na expresi *FLO11* prostřednictvím indukce exprese *GNP1*, *DIP5* a dalších genů kódujících příslušné transportéry aminokyselin.

#### 3.1.4.12 Vitamín B9

Güldener *et al.* (2004) zaznamenali úlohu genu *FOL1* na regulaci filamentárního růstu. Protein kódovaný genem *FOL1* katalyzuje 3 důležité kroky v dráze biosyntézy tetrahydrofolátu (vitamín B9, kyselina listová; Güldener *et al.*, 2004). U kmenů s delecí *fol1* dochází na bohatém živném médiu obohaceném kyselinou listovou k indukci invazivního růstu (haploidní kmeny) a pseudohyfálního růstu (diploidní kmeny), a to v přítomnosti glukózy i amonných iontů. Autoři zjistili, že tento invazivní růst je závislý na transkripčním faktoru FG MAPK dráhy (Ste12p) a na adhezinu Flo11p. Naopak pseudohyfální růst není závislý na Ste12p, Tec1p (transkripční faktor FG MAPK dráhy), Phd1p (transkripční faktor dráhy YAK1) ani na Flo11p.

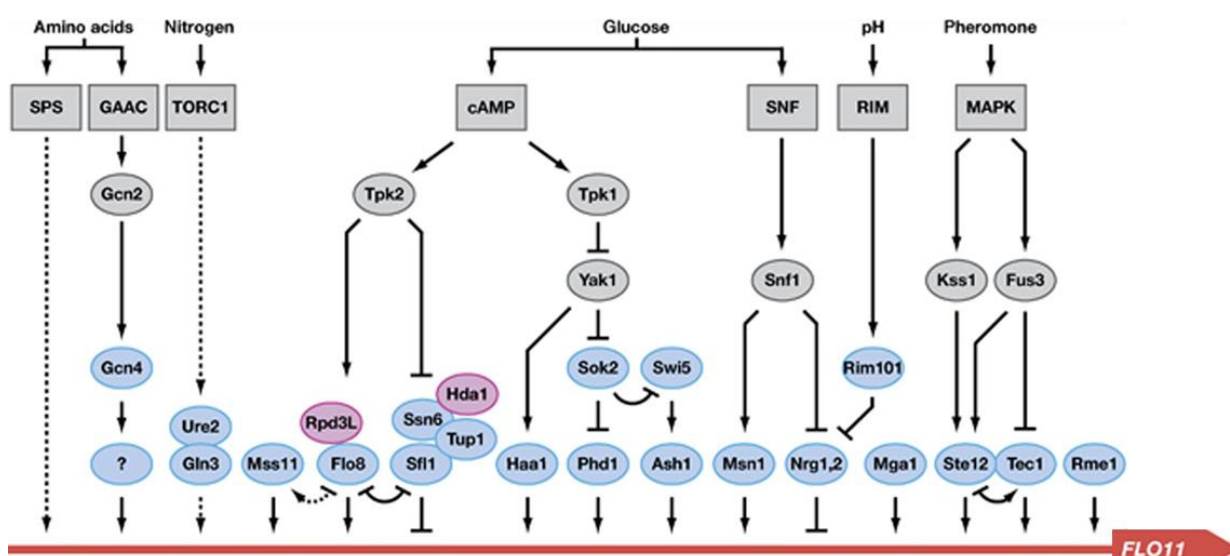
#### 3.1.4.13 Mitochondriální geny

Na regulaci filamentárního růstu se podílejí také mitochondriální geny. Celogenomové testování genů potřebných pro filamentární růst ukázalo, že respiračně deficientní  $\rho^0$  kmeny vykazují poruchu při tvorbě filament (Jin *et al.*, 2008). Aun *et al.* (2013) studovali poruchu pseudohyfálního a invazivního růstu u respiračně deficientních  $\rho^0$  a  $\rho^-$  kmenů a zjistili, že příčinou poruchy filamentárního růstu je snížení exprese *FLO11* jako důsledek inhibice dráhy RAS/PKA. Dráha FG MAPK u těchto kmenů postižena nebyla (Aun *et al.*, 2013). Liu a Butow (2006) předpokládali, že inhibice filamentárního růstu u *rho* kmenů je způsobena aktivací retrogradní dráhy (RTG dráha), která způsobí změnu exprese jaderných genů.

### 3.1.5 REGULACE EXPRESE *FLO11*

V předchozí kapitole jsem se pokusila shrnout nejdůležitější signální dráhy a regulátory, které se za různých podmínek podílejí na kontrole filamentárního růstu. Mnoho z těchto drah, včetně známých evolučně konzervovaných drah (RAS/PKA, FG MAPK, TOR a SNF1) přenáší signály na promotor genu *FLO11* (*MUC1*). Regulace genu kódujícího flokulin Flo11p je pro filamentární růst nepochybně velmi důležitá.

Promotor genu *FLO11* je neobvykle velký (3 kb) a obsahuje mnoho cílových míst pro transkripční regulátory (Rupp *et al.*, 1999). To svědčí o komplexní povaze promotoru a o vyhodnocování velkého množství podnětů najednou (obr. 3.15).



**Obr. 3.15.** Regulace exprese genu *FLO11*. Proteinkinázy jsou označeny šedou barvou. Chromatin-remodelující proteiny fialovou barvou. Transkripční faktory regulující promotor *FLO11* (červená čára) jsou označeny modrou barvou. (Upraveno podle Brückner a Mösch, 2012).

Za podmínek uhlíkového hladovění (u haploidních i diploidních kmenů) je exprese *FLO11* stimulována díky SNF1 dráze: Snf1p inaktivuje transkripční represory Nrg1p, Nrg2p a Mig1p (viz kapitola 3.1.4.3). Při dostatečném zdroji glukózy se uplatňuje RAS/PKA dráha. Role PKA při regulaci adhezivity je složitější. Její podjednotka Tpk2p stimuluje expresi *FLO11* aktivací transkripčního aktivátoru Flo8p a inaktivací inhibitoru Sfl1p (kap. 3.1.4.1). Podjednotka Tpk1p inhibuje expresi genu *FLO11*. Tpk1p totiž inhibuje kinázu Yak1p a následně transkripční faktor Sok2p inhibuje aktivátor exprese *FLO11*, Phd1p. Sok2p rovněž inhibuje transkripční faktor Swi5p a nepřímo také další aktivátor exprese genu *FLO11*, Ash1p (kap. 3.1.4.2). Flo8p funguje jako heterodimer společně s transkripčním regulátorem Mss11p (kap. 3.1.4.8)

Při nedostatku dusíku se uplatňuje TOR dráha (kap. 3.1.4.4). Její regulátory Gln3p a Ure2p, které aktivují expresi genů podléhajících dusíkové katabolické represí, rovněž pozitivně regulují filamentární růst. Není však jisté, zda přímo regulují expresi *FLO11*. Adhezivní růst je aktivován také při nedostatku aminokyselin (na médiu s dostatkem glukózy a amonných iontů). V tomto případě je exprese *FLO11* aktivována proteinkinázou Gcn2p a transkripčním faktorem Gcn4p. Gcn2p a Gcn4p jsou součástí systému GAAC (*general amino acid control*). Na regulaci *FLO11* se patrně podílejí i složky Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p (SPS) systému (kap. 3.1.4.11).

Promotor genu *FLO11* obsahuje také vazebnou sekvenci pro transkripční faktory FG MAPK dráhy Ste12p a Tec1p (kap. 3.1.4.7). Dalším regulátorem kontrolujícím expresi *FLO11* je transkripční faktor Msn1p (Phd2, Mss10). Msn1p reguluje pseudohyální diferenciaci a také

expresi glukoamylázy u kmenů *S. cerevisiae* sekretujících amylázu. Nadprodukce Msn1p vede k zesílenému invazivnímu a pseudohyálnímu růstu (a k účinnější degradaci škrobu díky aktivaci *STA2* genu; Lambrechts *et al.*, 1996). Nadprodukovaný Msn1p funguje jako supresor mutace *snf1* (Estruch a Carlson, 1990).

Regulátorem *FLO11* je také transkripční faktor Mga1p, který se podobá *heat shock* transkripčním faktorům (Lorenz a Heitman, 1998b), transkripční faktor Rme1p (viz kap. 3.1.4.9) a za podmínek acidického stresu transkripční faktor Haa1p. Vícekopiový gen *HAA1* suprimuje mutaci *yak1* (Malcher *et al.*, 2011).

Regulace exprese *FLO11* probíhá i během elongace transkripce. Podílí se na ní THO komplex, což je elongační komplex. Bylo zjištěno, že při mutaci proteinu THO komplexu je znemožněna elongace transkripce v oblasti tandemových repetit (Voynov *et al.*, 2006). Na posttranskripční kontrole exprese *FLO11* se podílí ribosomální protein Rps26p, který je nezbytný pro jeho efektivní translaci (Strittmatter *et al.*, 2006) a také RNA vazebný protein Khd1p. Khd1p jednak reprimuje transkripci *FLO11* nepřímo, prostřednictvím regulace *ASH1* mRNA, jednak se přímo váže na *FLO11* mRNA a tím inhibuje translaci (Wolf *et al.*, 2010). Tyto regulace umožňují asymetrickou expresi mezi mateřskou a dceřinou buňkou, která je nezbytná při přepnutí kvasinkové formy na pseudohyální růst. Flo11p je regulován také postranlačně. Karunanithi *et al.* (2010) popsali uvolňování Flo11p z povrchu buněk a roli proteázy Kex2p při štěpení a maturaci tohoto flokulinu (kap. 3.1.7).

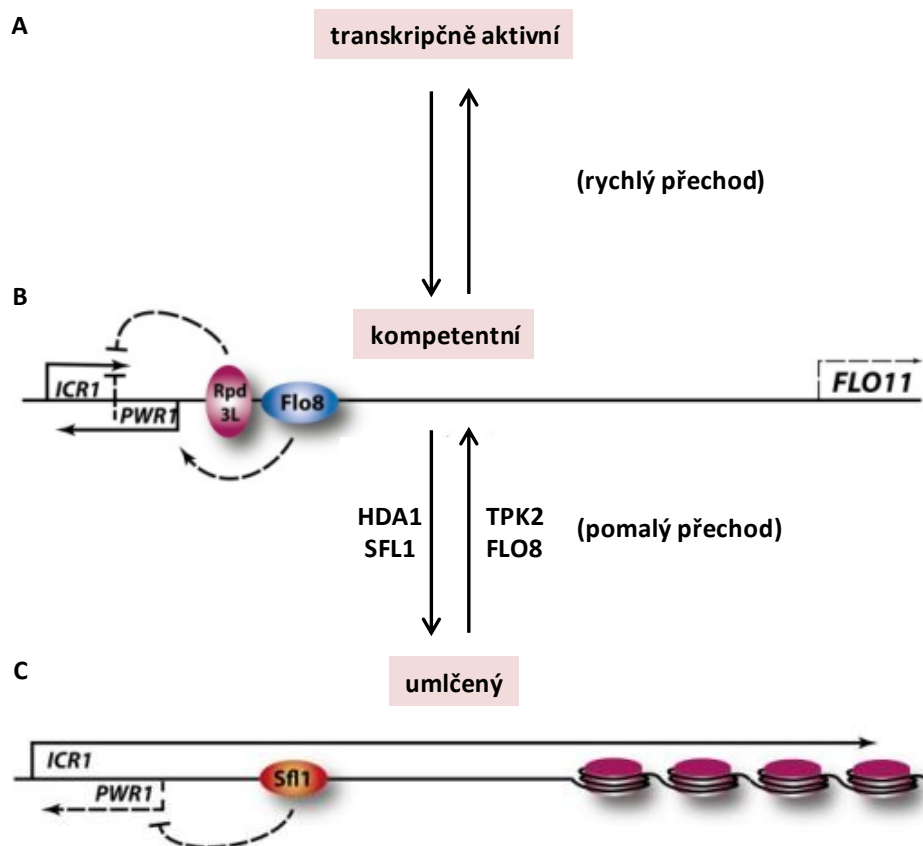
### Epigenetická regulace *FLO11*

Genetické a imunofluorescenční analýzy ukázaly, že exprese *FLO11* a přepnutí na filamentární růst za adekvátních výživových podmínek jsou regulovány také epigeneticky (Halme *et al.*, 2004). Epigenetické umlčení *FLO11* vysvětluje nejednotnost tvorby filament uvnitř geneticky homogenní kvasinkové kolonie. Kolonie vhodných diploidních kmenů *S. cerevisiae* za podmínek dusíkového hladovění sice tvoří pseudohyfy (Gimeno *et al.*, 1992), ale jen část buněk se na tvorbě filament podílí. Buňky tvořící pseudohyfy exprimují gen *FLO11*, ostatní buňky téže kolonie jsou v kvasinkové formě a *FLO11* neexprimují. Stejně tak u haploidních kmenů některé buňky v kolonii *FLO11* exprimují a některé ne (Halme *et al.*, 2004).

Umlčování genu *FLO11* je závislé na jeho umístění v genomu (přibližně 46 kb od konce chromozomu IX) a zároveň je také promotor specifické. Je-li totiž *FLO11* exprimován z *URA3* lokusu (přibližně 12 kb od centromery chromozomu V), k umlčování nedochází. A rovněž není umlčován gen *URA3*, pokud je se svým vlastním promotorem umístěn do *FLO11* lokusu na chromozomu IX. Regulace souvisí s chromatinovými modifikacemi, protože inaktivace genu pro jednu z kvasinkových histon deacetyláz (*HDA1*) vede k expresi *FLO11* ve všech buňkách. Inaktivní stav *FLO11*, který je dědičný po mnoho generací, je tedy patrně výsledkem dědičné epigenetické represe chromatinu, která se podobá pozičnímu efektu telomer (Halme *et al.*, 2004).

Umlčování genu *FLO11* je reverzibilní. *FLO11* promotor může přepínat mezi třemi různými stavy: epigeneticky umlčeným, kompetentním a transkripčně aktivním (Octavio *et al.*, 2009). Promotor v umlčeném stavu nemůže být transkripčně aktivní, ale s nízkou frekvencí může přecházet do kompetentního stavu, z něhož může velice rychle, působením vhodné kombinace transkripčních faktorů, přejít do transkripčně aktivního stavu (obr. 3.16). Při přechodu mezi umlčeným a kompetentním stavem se uplatňuje alternativní navázání transkripčních faktorů (regulovaných Tpk2p, podjednotkou proteinkinázy A): represoru Sfl1p (pro umlčený stav) a aktivátoru Flo8p (pro kompetentní stav), které regulují transkripci dvou nekódujících *upstream* RNA (*sense* transkript *ICR1* a *antisense* transkript *PWR1*). Sfl1p inhibuje transkripci *PWR1*, Flo8p aktivuje transkripci *PWR1*. Syntéza obou RNA je závislá na komplexu histondeacetylázy Rpd3L (Bumgarner *et al.*, 2009). Transkripce *ICR1* brání aktivaci promotoru *FLO11* (nukleozómy

blokují start). V případě exprese PWR1 je exprese ICR1 blokována. Promotor je potom v kompetentním stavu a exprese FLO11 je regulována velkým množstvím aktivátorů a inhibitorů v závislosti na výživových a jiných podmínkách (obr. 3.15).



**Obr. 3.16.** Epigenetická regulace genu *FLO11*. Promotor *FLO11* přepíná mezi transkripčně aktivním (A), kompetentním (B) a epigeneticky umlčeným stavem (C). (Upraveno podle Broach, 2012).

Epigenetická regulace (umlčování) se uplatňuje také u genu *FLO10*. U laboratorního kmene  $\Sigma 1278b$  je transkripčně aktivní gen *FLO11* (Guo *et al.*, 2000), geny pro ostatní flokuliny včetně *FLO10* jsou za normálních okolností umlčené. Halme *et al.* (2004) zjistili, že k expresi genu *FLO10* dochází v případě mutace v genech *IRA1* nebo *IRA2* (kódují GAP pro GTPázu Ras2p), která vede ke konstitutivní aktivaci RAS/PKA dráhy (viz kapitola 3.1.4.1). *IRA* geny jsou velmi nestabilní; mutace v těchto genech vznikají spontánně s vysokou frekvencí (přibližně  $10^{-3}$ ). Haploidní kmeny (odvozené od  $\Sigma 1278b$ ) s mutací *ira1* nebo *ira2* mají výrazně „vrásčitou“ morfologii a zvýšeně adhezuji k agaru. *ira* mutanty nevyžadují *FLO11* pro invazivní růst a adhezi. Důvodem je právě exprese *FLO10*. *ira* mutanty také výrazně flokulují, za což odpovídá rovněž exprese *FLO10*. Ovšem pro „vrásčitou“ morfologii *ira* kolonií je nezbytná exprese *FLO11*. Analýza mRNA pomocí *Northern blotu* prokázala, že v *ira* mutantních kmenech oproti rodičovským kmenům je hladina *FLO11* mRNA dvojnásobná a hladina *FLO10* mRNA dvanáctinásobná (Halme *et al.*, 2004).

Epigenetické umlčování genu *FLO10* je podobně jako u genu *FLO11* reverzibilní. Dochází k častému přepínání mezi stavem, kdy buňka *FLO10* exprimuje a kdy neexprimuje. Regulace *FLO10* souvisí s chromatinovými modifikacemi, protože mutace genů pro histon deacetylázy (*HST1*, *HST2*) vede k expresi *FLO10* ve všech buňkách. Pro umlčení *FLO10* musí být obě histon deacetylázy funkční. Umlčování je pozičně závislé (*FLO10* leží pouhých 17 kb od telomery) a promotor specifické. Na regulaci se stejně jako v případě genu *FLO11* podílejí transkripční faktory Sfl1p a Flo8p (Halme *et al.*, 2004).

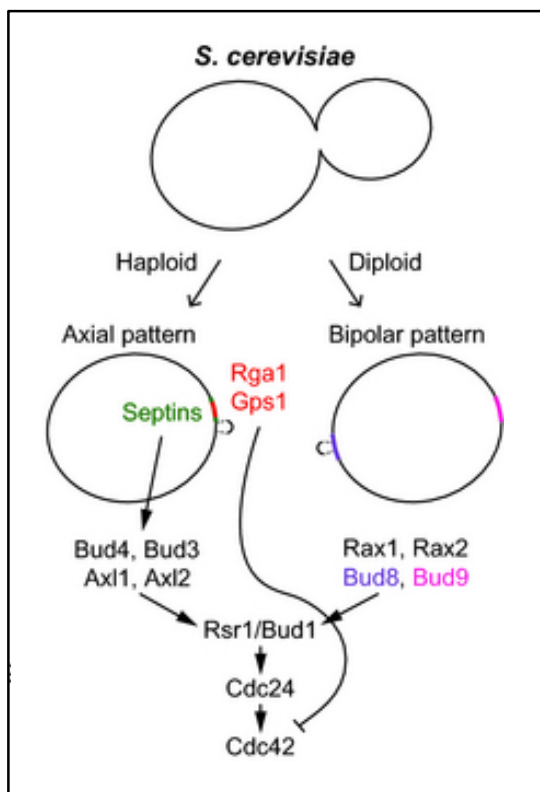


### 3.1.6 REGULACE POLARIZOVANÉHO RŮSTU A BUNĚČNÉHO CYKLU

Jednou z podmínek filamentárního růstu je schopnost polarizovaného růstu, konkrétně schopnost přepnout axiální typ pučení u haploidů a bipolární typ pučení u diploidů na pučení monopolární.

Polarizovaný růst zajišťují distální a proximální kortikální značky asociované s plazmatickou membránou (obr. 3.17). U haploidů rostoucích axiálně se uplatňují značky Bud3p, Bud4p, Axl1p a Axl2p (Bud10p). U diploidů je to distální značka Bud8p, která je lokalizována do předpokládaného místa vzniku pupenu, a proximální značka Bud9p, která je umístěna později, až těsně před cytokinezí. Lokalizace Bud8p a Bud9p vyžaduje přítomnost dalších membránových proteinů Rax1p a Rax2p. Pro správný výběr místa pučení u haploidů i diploidů jsou potřebné další tři geny kódující Rsr1p (Bud1p; malá GTPáza rodiny Ras), Bud5p (GEF proteinu Rsr1p) a Bud2p (GAP proteinu Rsr1p). Všechny tyto tři proteiny jsou lokalizovány v místě vznikajícího pupenu. Při delecí *bud1*, *bud2* nebo *bud5* dochází k náhodnému pučení (přehledové články Bi a Park, 2012; Martin a Arkowitz, 2014).

Při polárním pučení diploidních buněk jsou značky Bud8p a Bud9p rozpoznány GTPázou Rsr1p (Bud1p). Aktivní Rsr1p (Rsr1p-GTP) interaguje s Cdc42p (GTPáza rodiny Rho) a s Cdc24p (GEF pro Cdc42p; obr. 3. 17). Výsledkem je lokalizace Cdc42p do předpokládaného místa vzniku pupenu na plazmatické membráně. Cdc42p se podílí na reorganizaci aktinového cytoskeletu, Cdc42p interaguje s forminem Bni1p. Bni1p společně s Bud6p, který se váže na aktin, Spa2p (*scaffold* protein), Pea2p a dalšími proteiny skládá kvasinkový polarisom lokalizovaný na distálním konci vznikající dceřiné buňky. Bni1p nukleuje aktinová vlákna. Podél aktinových vláken dochází k transportu buněčného materiálu do místa polarizovaného růstu na dceřiné buňce. Při axiálním pučení haploidních buněk se rovněž uplatňuje modul Rsr1p a příslušné kortikální značky (obr. 3.17, přehledové články Bi a Park, 2012; Martin a Arkowitz, 2014).



Obr. 3.17. Regulace polarizovaného růstu u *S. cerevisiae*. (Převzato z Martin a Arkowitz, 2014).

Geny potřebné pro kontrolu typu pučení jsou samozřejmě nezbytné pro filamentární růst, jehož podstatnou charakteristikou je monopolární typ pučení. Mnoho z těchto genů bylo studováno již v prvopočátku výzkumu filamentárního růstu. Mutace v genu *RSR1(BUD1)*, která způsobuje náhodné neorientované pučení (Chant a Herskowitz, 1991), znemožňuje tvorbu pseudohyf u diploidů (Gimeno *et al.*, 1992). Geny *RSR1(BUD1)*, *BUD2* (kóduje GAP pro Rsr1p), *BUD3*, *BUD4* a *BUD5* (kóduje GEF pro Rsr1p) jsou nezbytné pro filamentární růst haploidních buněk (Roberts a Fink, 1994). Bud8p je nutný pro monopolární pučení během filamentárního růstu u diploidů (Taheri *et al.*, 2000) i haploidů (Cullen a Sprague, 2002). Rovněž mutace v genu *PEA2* negativně ovlivňuje tvorbu filament. Song *et al.* (2014) zjistili, že přirozeně vzniklá mutace (záměna Leu na pozici 409 za Met) v genu *PEA2* v genomu kmene BY4741 (kmen odvozený od S288C) přispívá k neschopnosti invazivního růstu u tohoto kmene.

Při změně typu pučení se patrně uplatňuje FG MAPK dráha. Při výběru místa pučení se uplatňuje receptor Msb2p/Sho1p, který monitoruje dostupnost živin. Tento receptor je lokalizován na buněčném povrchu do míst polarizovaného růstu. Mutace genů *msb2*, *sho1* a *ste12*, které způsobují defekt při výběru místa pučení, také negativně ovlivňují prodlužování buněk (zejména *ste12*; Cullen *et al.*, 2004). Mutace *ste12* a ve větší míře mutace *ste20* negativně ovlivňují přepínání typu pučení (Cullen a Sprague, 2000). Důležitou roli Ste20p potvrdily i další výsledky. Ste20p je v diploidních buňkách důležitý pro apikální růst a výběr místa pučení (bipolární pučení), zatímco Ste11p a Ste7p nejsou nutné pro apikální růst ani pro bipolární výběr místa pučení (Sheu *et al.*, 2000).

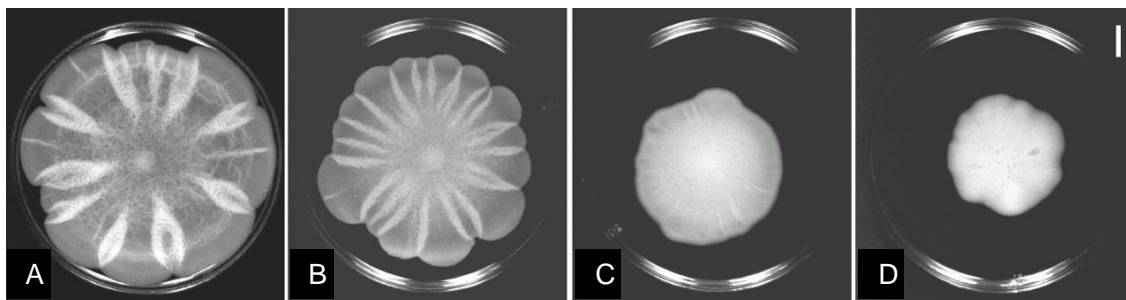
Podle jiných autorů reguluje monopolární pučení u diploidů dráha RAS/PKA (Pan a Heitman, 1999). Z dalších výsledků zase vyplývá, že FG MAPK ani RAS/PKA dráha nejsou nutné pro monopolární pučení u haploidů (Chen a Thorner, 2010).

Pro regulaci filamentárního růstu jsou důležité G1 cykliny a také elementy morfogenetického kontrolního bodu (konec G2 fáze), např. proteinkináza Swe1p (La Valle a Wittenberg, 2001). Kináza Swe1p se podílí na přechodu z apikálního růstu na izotropický (v G2 fázi buněčného cyklu).

### 3.1.7 BIOFILMY A „MATY“

Kmeny *S. cerevisiae* odvozené od  $\Sigma 1278b$  adherují k agaru, což umožňuje glykoprotein Flo11p lokalizovaný na buněčném povrchu (Lo a Dranginis, 1998; Guo *et al.*, 2000). Kmeny se stejným genetickým pozadím také přirozeně tvoří biofilmy. Vznikají v tekutém médiu na pevném povrchu, na polystyrenu, polypropylenu a v menší míře také na PVC. Adheze k plastu je zesílena při nižší koncentraci glukózy. Bylo prokázáno, že podmínkou pro vytvoření biofilmu je exprese genu *FLO11*. Buňky neexprimující *FLO11* adherují jen velmi slabě (Reynolds a Fink, 2001).

Dalším fenotypem závislým na Flo11p je u kmenů odvozených od  $\Sigma 1278b$  specifický typ obří kolonie, který vzniká na polotekutém komplexním médiu s glukózou (např. 0,3% agar) při pokojové teplotě. Tyto kolonie byly označeny jako „maty“ (*mats*; Reynolds a Fink, 2001; Ryan *et al.*, 2012). „Maty“ jsou ploché, nápadně se rozrůstají do plochy a jsou charakteristicky strukturované. Střed těchto jinak hladkých kolonií je tvořen sítí kabelů; ze středu vycházejí radiálně paprsky (obr. 3.18A). Středová síť a paprsky jsou zřetelnější při kultivaci při nižší teplotě (25 °C oproti 30 °C). Při kultivaci na médiu s nízkou koncentrací glukózy (0,25%) vznikají rychleji.



**Obr. 3.18.** Kvasinkové „maty“ jsou se vzrůstající ploidií méně vyvinuté. **A**, MAT $\alpha$  (n); **B**, MAT $\alpha\alpha$  (2n); **C**, MAT $\alpha\alpha\alpha$  (3n); **D**, MAT $\alpha\alpha\alpha\alpha$  (4n). (Převzato z Reynolds a Fink, 2001).

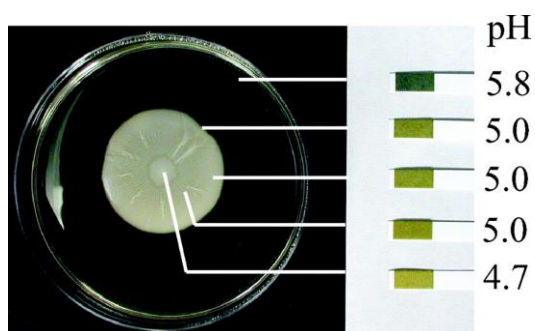
Ukázalo se, že flokulin Flo11p a také transkripční faktor Flo8p jsou pro tvorbu „matů“ nezbytné; mutanty *flo11* se po agaru nerozrůstají a mají amorfni strukturu. Reynolds a Fink (2001) měřili hydrofobicitu buněk a zjistili, že buňky exprimující *FLO11* jsou více hydrofobní než buňky s mutací *flo11*. To je patrně důvod, proč *FLO11* zesiluje adhezi buněk k plastu a zároveň usnadňuje tvorbu „matů“ na 0,3% agaru. Redukce interakcí mezi buněčným povrchem a vlhkým povrchem agaru může usnadnit pohyb buněk po agaru.

Zajímavé je, že v „matech“ nebyly nalezeny žádné pseudohyfální buňky, které jsou rovněž závislé na expresi *FLO11*. Pozorovány byly pouze oválné kvasinkové buňky stejně jako v koloniích rostoucích na médiu se standardním 2% agarem. Morfologie „matů“ se jen mírně liší u haploidů opačného párovacího typu. Oproti tomu vzrůstající ploidie kmene (2n, 3n a 4n) je spojena se zmenšováním průměru a také se ztrátou strukturovanosti „matu“ (obr. 3.18). „Maty“ tetraploidního kmene se 4 kopiemi genu *FLO11* mají stejnou amorfni strukturu jako „maty“ mutantního kmene *flo11* (Reynolds a Fink, 2001). Toto pozorování je v souladu se zjištěním, že transkripce *FLO11* klesá s rostoucí ploidií (Galitski *et al.*, 1999).

Centrální strukturovaná část „matů“ je tvořena agregáty buněk, které adherují k sobě navzájem a také k povrchu agaru (a rostou jen pomalu). Hladká okrajová část „matů“ je tvořena dělící se a rozrůstající se populací buněk, které příliš neadherují, a to ani k sobě navzájem, ani k povrchu agarového média. Přitom Flo11p je produkován v obou částech „matů“. Možné vysvětlení přineslo zjištění, že „mat“ vytváří v agaru gradient glukózy (nejnižší koncentrace je ve středové části) a také gradient pH. V okrajové části je pH vyšší, a to snižuje

adhezivitu produkovaného Flo11p a tím i adhezivitu buněk v této části kolonie (obr. 3.19; Reynolds *et al.*, 2008).

Gradient glukózy a gradient pH jsou nezbytné pro diferenciaci středové a okrajové části „matu“. Zvýšení koncentrace glukózy v médiu zapříčinilo zpoždění nebo inhibici tvorby „matu“. Použití živných médií pufovaných na pH 4,9; 5,4 nebo 5,8 rovněž zabránilo vývoji standardně diferencovaného „matu“. Při pH 4,9 veškerá biomasa připomínala centrální strukturovanou část standardního „matu“, buňky byly adhezivní. Při pH 5,8 byl povrch celé kolonie hladký, buňky nebyly adhezivní (Reynolds *et al.*, 2008). Vliv pH se uplatňuje i při jiném adhezivním fenotypu závislém na Flo11p, při flokulaci. U kmenů exprimujících *FLO11* (*S. cerevisiae* var. *diastaticus*) byla pozorována flokulace při pH 3,9 a 5,5. Při pH 7,1 k flokulaci nedošlo (Bayly *et al.*, 2005).



**Obr. 3.19.** Během vývoje „matu“ vzniká pH gradient. pH živného média bylo původně 5,8; k nejvýraznějšímu okyselení došlo v centrální části „matu“. (Převzato z Reynolds *et al.*, 2008).

Skupina P. J. Cullena v roce 2010 publikovala zjištění, že se Flo11p uvolňuje z povrchu buněk do extracelulárního prostředí, což zásadně ovlivňuje adhezivitu buněk. Uvolňování Flo11p během vývoje „matů“ oslabuje adhezivitu, a to patrně dvěma způsoby. Zprvu přímo, tj. tím že na povrchu buněk ubývá molekul Flo11p. Zadruhé tím, že uvolněné molekuly Flo11p znesnadňují adhezi molekul, které jsou stále ukotvené na povrchu buněk, k agarovému substrátu. Dochází totiž ke kompetici mezi vázanými a uvolněnými molekulami Flo11p (Karunanithi *et al.*, 2010).

„Maty“, které uvolňují Flo11p ve zvýšené míře (produkující Flo11p bez GPI kotvy), se rozrůstají více než rodičovský kmen a více než kmen bez flokulinu ( $\Delta flo11$ ). „Maty“ s omezeným uvolňováním Flo11p (nadprodukce Flo11p) se rozrůstají málo (ale více než kmeny s delecí *flo11*). Zdá se, že pro optimální rozrůstání na agaru je nutná kombinace molekul ukotvených na buněčném povrchu a molekul uvolněných do extracelulárního prostředí. Ztráta GPI kotvy a nadprodukce Flo11p ovlivňuje rovněž invazivní růst na standardním komplexním médiu. Kmeny, které uvolňují Flo11p ve zvýšené míře, méně zarůstají do agaru. Kmeny s omezeným uvolňováním Flo11p ve zvýšené míře zarůstají do agaru. (Karunanithi *et al.*, 2010)

K uvolňování Flo11p nedochází pod celou kolonií rovnoměrně. Pomocí *Western blotu* proteinu Flo11p značeného HA značkou a následné imunodetekce byl odhalen radiálně paprscitý charakter oblastí uvolňujících Flo11p. Stejní autoři dále zjistili, že Flo11p je důležitou součástí tekuté vrstvy obklopující kvasinkové „maty“ a že proteáza Kex2p je nezbytná pro štěpení a maturaci Flo11p (Karunanithi *et al.*, 2010).

Tvorba „matů“ je pro kvasinky efektivní způsob růstu. Stejný kmen, rostoucí 12 dní na různých ztužených médiích při stejné teplotě totiž vyprodukuje na 0,3% agaru osmkrát více buněk než na 2% agaru (Reynolds a Fink, 2001). Morfologii „matu“ rostoucího na živném médiu na 0,3% agaru ovlivňuje zdroj uhlíku v médiu. Radiální paprsky vznikají pouze při kultivaci na glukóze nebo fruktóze. Na glycerolu nebo galaktóze vznikají kroužky (Palecek *et al.*, 2002).

Vývoj „matů“ u *S. cerevisiae* připomíná chování bakterie *Mycobacterium smegmatis*. Tyto bezbičíkaté bakterie se vyznačují tvorbou biofilmů a specifickým způsobem pohybu, označovaným termínem *sliding motility*. Jedná se o formu pohybu, která je výsledkem působení expanzivní síly rostoucí bakteriální populace za podmínek sníženého tření mezi buňkami a substrátem. Dochází k němu na pevných médiích s nízkou koncentrací agaru. Na stejně koncentrovaných médiích se tvoří kvasinkové „maty“. Role flokulinu Flo11p při adhezi *S. cerevisiae* připomíná roli glykolipoproteinů (GPL) lokalizovaných na povrchu bakterie *M. smegmatis*. GPL zvyšují povrchovou hydrofobicitu. Mutanty *M. smegmatis* s poruchou syntézy GPL se vyznačují defektem v tvorbě biofilmů a defektem ve *sliding motility* (Recht *et al.*, 2000).

Tvorba „matů“ a filamentární růst mají mnoho společných rysů. Oba jevy vznikají v důsledku hladovění a jsou podobně regulovány. Bylo identifikováno mnoho regulačních faktorů, které regulují jak filamentární růst, tak tvorbu „matů“, mezi něž patří Rim101p (Lamb a Mitchell, 2003; Sarode *et al.*, 2011), Opi1p (Reynolds, 2006), Ras2p (Mösch *et al.*, 1996), Yak1p (Malcher *et al.*, 2011) a Flo8p (Rupp *et al.*, 1999). Karunanithi *et al.* (2012) prokázali podobný způsob regulace obou jevů také prostřednictvím FG MAPK dráhy. Vzhledem k tomu, že filamentární růst a tvorba „matů“ závisí na přítomnosti Flo11p a jsou podobně regulovány, bylo překvapivé, že v „matech“ nebyly nalezeny pseudohyální buňky (Reynolds a Fink, 2001). Důvodem byl patrně dostatek živin, protože kultivace probíhala na bohatém komplexním médiu. Při pozdějších experimentech, při nichž byly „maty“ kultivovány na médiu s nedostatkem glukózy, byla pozorována tvorba pseudohyf na okraji „matů“ (Karunanithi *et al.*, 2012).

### 3.1.8 ZÁVĚR

---

Filamentární růst kvasinek je velmi složitý a komplexní proces. Zahrnuje v sobě přepínání na monopolární typ pučení, protahování buněk, zvyšování adhezivity a invazivní růst a podílí se na něm více než 500 genů (Shively *et al.*, 2013). Plné pochopení všech otázek souvisejících s filamentárním růstem komplikuje skutečnost, že se na jeho regulaci podílí mnoho signálních drah, které se různými způsoby prolínají a že studované jevy často probíhají jinak v haploidních a jinak v diploidních kmenech. Rovněž genetické pozadí studovaného kmene hraje důležitou roli. Výsledky z různých laboratoří si občas i protiřečí.

Nejvíce informací o filamentárním růstu *S. cerevisiae* bylo získáno studiem kmenů odvozených od  $\Sigma 1278b$ . Některé výsledky ukazují, že dvě nejvýznamnější signální dráhy FG MAPK a RAS/PKA fungují na sobě nezávisle, alespoň při regulaci pseudohyálního růstu diploidních buněk (Pan a Heitman, 1999). Z jiných výsledků ale vyplývá, že při haploidním invazivním růstu obě dráhy sdílejí GTPázu Ras2p a že RAS/PKA dráha reguluje FG MAPK dráhu (Mösch *et al.*, 1999). Další publikace nabízí opačné zjištění. Protože haploidní buňky bez Fus3p nebo Kss1p vykazovaly změněnou hladinu cAMP, autoři vyvodili, že FG MAPK dráha reguluje RAS/PKA dráhu (Cherkasova *et al.*, 2003).

Chen a Thorner (2010) se pokusili zjistit, jakou měrou se obě dráhy (FG MAPK a RAS/PKA) podílejí na regulaci konkrétních aspektů filamentárního růstu. Provedli komplexní epistatickou analýzu haploidních kmenů s různými kombinacemi mutací všech důležitých komponent zmíněných drah. Zjistili, že plná aktivace jedné nebo druhé dráhy je dostatečná pro zajištění invazivního růstu. Důvodem, proč se na invazivním růstu běžně podílejí obě dráhy, je ten, že za běžných podmínek žádná z nich není maximálně aktivovaná. Autoři zjistili, že u haploidních buněk ovlivňuje prodlužování buněk a především mezibuněčnou adhezivitu více FG MAPK dráha (Ste12p) než RAS/PKA dráha (Flo8p). Oproti tomu monopolární pučení indukované

nedostatkem glukózy se ukázalo na obou drahách nezávislé. Bylo nezávislé na Ste12p a Flo8p, stejně jako na Tpk2p (RAS/PKA dráha; Chen a Thorner, 2010). U diploidních buněk je úloha jednotlivých drah při těchto procesech odlišná. Při nedostatku živin reguluje prodlužování buněk FG MAPK dráha, monopolární pučení reguluje PKA dráha a obě dráhy regulují adhezivitu (Pan a Heitman, 1999).

Studium regulace filamentárního růstu komplikuje další skutečnost - variabilita používaných kmenů. Stejná mutace totiž může mít v kmenech s různým genetickým pozadím úplně jiný fenotypový projev. Dowell *et al.* (2010) deletovali 5100 genů u kmenů  $\Sigma$ 1278b a S288C a našli 44 genů, které jsou esenciální pouze u  $\Sigma$ 1278b a 13 genů, které jsou esenciální pouze u S288C. Odlišný fenotyp, jako důsledek delece stejného genu v různých i když příbuzných kmenech, vysvětluje existence komplexních genetických interakcí, které zahrnují mnoho modifikátorů, které se u různých kmenů liší. Chin *et al.* (2012) obdobně studovali deleční knihovny kmenů schopných filamentárního růstu  $\Sigma$ 1278b a S288C-*FLO8* (použili upravený kmen s funkčním genem *FLO8*) a dospěli k překvapivému zjištění. Zjistili, že u kmene S288C-*FLO8* dráha FG MAPK není potřebná pro filamentární růst, a to přesto že geny FG MAPK dráhy jsou aktivní v jiných drahách. Důvodem, proč je u kmene  $\Sigma$ 1278b dráha FG MAPK pro filamentární růst nezbytná a u kmene S288C-*FLO8* není, je polymorfismus genu pro transkripční faktor Rpi1p. Alela *RPI1*<sup>S288C</sup> je aktivní a suprimuje ztrátu funkce FG MAPK dráhy, zatímco alela *RPI1* <sup>$\Sigma$ 1278b</sup> je inaktivní a není schopna suprimovat defekt FG MAPK dráhy.

Laboratoře studující kvasinku *S. cerevisiae* nepoužívají ke svému výzkumu příliš rozmanité zástupce tohoto druhu. Většina laboratorních mutantních kmenů a kmenů vzniklých křížením bylo odvozeno od kmene S288C (nebo od kmenů blízké příbuzných). Genealogická studie (Mortimer a Johnston, 1986) odhalila, že tento kmen pochází z šesti původních kmenů: EM93, EM126, NRRL YB-210 a tří pekařských kmenů Yeast Foam, FLD a LK, přičemž přibližně 88 % genů pochází od kmene EM93.

Kmen nejvíce používaný pro studium filamentárního růstu, kmen *S. cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b je přímý příbuzný kmene S288C. 47 % jeho genomu se neliší od S288C (Winzeler *et al.*, 2003). Sekvence 46 % ORFů v  $\Sigma$ 1278b je identická s ORFy v S288C. (Dowell *et al.*, 2010). Kmen  $\Sigma$ 1278b rovněž sdílí několik menších genomových oblastí s kmenem W303, který je rovněž odvozen od S288C (Ralser *et al.*, 2012). Na rozdíl od kmene  $\Sigma$ 1278b naprostá většina laboratorních kmenů nemá schopnost růst ve formě filament. Důvodem jsou mutace, které filamentární růst znemožňují (Liu *et al.*, 1996). Analýza standardního laboratorního kmene S288C ukázala, že kmen nese mutaci spočívající v záměně jedné báze, která je příčinou vzniku stop kodonu v kódující sekvenci genu *FLO8*. Důsledkem této mutace je neschopnost pseudohyfálního růstu, invazivního růstu a také neschopnost flokulace. Po vnesení plazmidu s nemutovaným genem *FLO8* do kmene S288C došlo k obnovení flokulace a pseudohyfálního fenotypu. Invazivní růst u haploida se obnovil také, ale jen v malé míře. Je tedy pravděpodobné, že kmen nese ještě nějakou další mutaci ovlivňující filamentární růst. Transformace *FLO8* do dalšího kmene s recesivní mutací *flo8* (W303) k obnově filamentárního růstu vůbec nevedla. Je zřejmé, že u tohoto kmene jsou kromě *flo8* ještě další mutace (Liu *et al.*, 1996, Bester *et al.*, 2006).

Mutace *flo8* byla patrně nechtěně vyselektována kvasinkovými genetiky. Víme totiž, že diploidní předek kmene S288C, kmen EM93, je homozygotní ve funkčním genu *FLO8*. Kmeny s funkčním *FLO8* mají schopnost flokulace, což komplikuje provádění některých klasických genetických postupů. Flokulující kvasinkové buňky nezůstávají v suspenzi a ztěžují tak měření růstové rychlosti. Rovněž je obtížné získat monokoloniové izoláty, klony pocházející z jediné buňky, a provádět „razítkování“ kolonií (*replica-planting*). Snadno si představit, že si genetici v určité chvíli pro další experimenty vybrali neflokulující klon, se kterým se bude snáze pracovat (Liu *et al.*, 1996).

Song *et al.* (2014) zjistili, že se na neschopnosti invazivního růstu u kmene BY4741 odvozeného od S288C podílí také mutace v genu *PEA2* (záměna Leu na pozici 409 za Met). Gen *PEA2* kóduje složku polarisomu. Stejná mutace způsobí u kmene  $\Sigma$ 1278b snížení invazivního

růstu a prodlužování buněk. V některých liniích s pozadím  $\Sigma 1278b$  byla objevena *nonsense* mutace v genu *RIM15*, která mění kodon pro glycin ve stop kodon. Mutace *rim15* epistaticky interaguje s mutacemi v dalších genech a ovlivňuje morfologii kolonií. Je možné, že tato mutace ovlivňuje rovněž pseudohyfální růst (Granek a Magwene, 2010).

Díky výše zmíněným mutacím většina laboratorních kmenů *S. cerevisiae* ztratila schopnost tvořit filamenta. S tím souvisí také ztráta adhezivity u těchto kmenů a tvorba málo strukturovaných kolonií. Naopak divoké kmeny izolované z přírody běžně tvoří jak pseudohyfy (Casalone *et al.*, 2005) tak strukturované kolonie (Šťovíček *et al.*, 2010). Filamentární růst a tvorba biofilmů je tedy pro kvasinky *S. cerevisiae* přirozená a důležitá růstová alternativa, která umožňuje nepohyblivým buňkám dostat se efektivněji ke vzdálenému zdroji živin, pronikat do polopevného substrátu a umožňuje přežít za nepříznivých okolností v rámci mikrobiálních společenství (biofilmy, kolonie).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 MATERIÁL

#### 4.1.1 POUŽITÉ MIKROORGANIZMY

*Escherichia coli* DH5α ( *supE44*,  $\Delta$ *lacU169*,  $\Phi$ 80 *lacZ*Δ*M15*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*)

**Tab. 4.1.** Kmeny *Saccharomyces cerevisiae* použité v této práci. Pl ploidie; <sup>h</sup> haploid; <sup>d</sup> diploid

kmen	Pl	genotyp	zdroj / reference *
BY-Ato1p-GFP	n	<i>MATα</i> , <i>ATO1</i> -GFP, <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i>	V. Plocek; fúzní protein Ato1p-GFP
BY4742	n	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i>	sbírka EUROSCARF
BS	n	<i>MATα</i> , <i>ade2Δ</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i>	tato práce; delece <i>ADE2</i>
BSCu	n	<i>MATα</i> , <i>ade2Δ</i> , <i>Pcup1</i> - <i>ADE5,7</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i>	tato práce; delece <i>ADE2</i> , promotor <i>CUP1</i>
BSgal	n	<i>MATα</i> , <i>ade2Δ</i> , <i>Pgal1</i> - <i>ADE5,7</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i>	tato práce; delece <i>ADE2</i> , promotor <i>GAL1</i>
GRF18 <sup>h</sup>	n	<i>MATα</i> , <i>his3</i> , <i>leu2-3,112</i>	G. R. Fink
GRF18 <i>bud2</i> <sup>h</sup>	n	<i>MATα</i> , <i>bud2</i> , <i>his3</i> , <i>leu2-3,112</i>	tato práce; disrupce <i>BUD2</i>
KT308 <sup>h</sup>	n	<i>MATα</i> , <i>RAS</i> <sup>+</sup> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys1</i> , <i>lys2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3</i>	A. Pichová
KT308 <i>bud2</i> <sup>h</sup>	n	<i>MATα</i> , <i>bud2</i> , <i>RAS</i> <sup>+</sup> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys1</i> , <i>lys2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3</i>	tato práce; disrupce <i>BUD2</i>
OB85 <sup>h</sup>	n	<i>MATα</i> , <i>ade2</i> , <i>leu2-Δ1</i> , <i>ura3-52</i>	V. Larionov
OB85 <i>bud2</i> <sup>h</sup>	n	<i>MATα</i> , <i>bud2</i> , <i>ade2</i> , <i>leu2-Δ1</i> , <i>ura3-52</i>	tato práce; disrupce <i>BUD2</i>
OL1 <sup>h</sup>	n	<i>MATα</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>ura3</i>	E. C. Hurt
OL1 <i>bud2</i> <sup>h</sup>	n	<i>MATα</i> , <i>bud2</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>ura3</i>	tato práce; disrupce <i>BUD2</i>
P1 <sup>h</sup>	n	<i>MATα</i> , <i>leu2-3,112</i>	tato práce; haploid od P23-23 <sup>d</sup>
P1 <i>bud2</i> <sup>h</sup>	n	<i>MATα</i> , <i>bud2</i> , <i>leu2-3,112</i>	tato práce; disrupce <i>BUD2</i>
P2 <sup>h</sup>	n	<i>MATα</i> , <i>leu2-3,112</i>	tato práce; haploid od P23-23 <sup>d</sup>
P2 <i>bud2</i> <sup>h</sup>	n	<i>MATα</i> , <i>bud2</i> , <i>leu2-3,112</i>	tato práce; disrupce <i>BUD2</i>
PD <sup>d</sup>	2n	<i>MATα</i> / <i>MATα</i> , <i>leu2-3,112</i>	tato práce; křížení P1 <sup>h</sup> and P2 <sup>h</sup>
PD <i>bud2</i> <sup>d</sup>	2n	<i>MATα</i> / <i>MATα</i> , <i>bud2</i> , <i>leu2-3,112</i>	tato práce; disrupce <i>BUD2</i>
P23-23 <sup>d</sup>	2n	<i>MATα</i> / <i>MATα</i> , <i>leu2-3,112</i>	DMUP
YPH499 <sup>h</sup>	n	<i>MATα</i> , <i>ade2</i> , <i>his3</i> , <i>leu2-Δ1</i> , <i>lys2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3</i>	Sikorski & Hieter (1989)
YPH499 <i>bud2</i> <sup>h</sup>	n	<i>MATα</i> , <i>bud2</i> , <i>ade2</i> , <i>his3</i> , <i>leu2-Δ1</i> , <i>lys2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3</i>	tato práce; disrupce <i>BUD2</i>



$\Sigma S^h$	n	<i>MATa</i>	tato práce; haploid od $\Sigma 1278^d$
$\Sigma S^h$ - <i>flo11</i>	n	<i>MATa, flo11::kan<sup>r</sup>, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i>	V. Šťovíček; delece <i>FLO11</i>
$\Sigma S^h$ - <i>Flo11p</i> -GFP	n	<i>MATa, FLO11-GFP, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i>	V. Šťovíček; fúzní protein Flo11p-GFP
$\Sigma SG^d$	2n	<i>MATa/MATα</i>	tato práce; křížení $\Sigma S^h$ a GRF18 <sup>h</sup>
$\Sigma SGH^h$	n	<i>MATα, leu2-3,112</i>	tato práce; haploid od $\Sigma SG^d$
$\Sigma SGHbud2^h$	n	<i>MATα, bud2, leu2-3,112</i>	tato práce; disrupce <i>BUD2</i>
$\Sigma 1278^d$	2n	<i>MATa/MATα</i>	H. Sychrová
<b>15B-AT34<sup>h</sup></b>	n	<i>MATa, his3, leu2-3,112, trp1</i>	V. Larionov
<b>15B-AT34bud2<sup>h</sup></b>	n	<i>MATa, bud2, his3, leu2-3,112, trp1</i>	tato práce; disrupce <i>BUD2</i>
<b>78<sup>h</sup></b>	n	<i>MATα, his4, leu2-3,112, ura</i>	G. R. Fink
<b>78bud2<sup>h</sup></b>	n	<i>MATα, bud2, his4, leu2-3,112, ura</i>	tato práce; disrupce <i>BUD2</i>

\* E. C. Hurt, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, SRN; V. Larionov, Ústav cytologie, AV SSSR, Leningrad, Rusko; G. R. Fink, Whitehead Institute for Biomedical research, MIT, Massachusetts, USA; A. Pichová, Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha, Česká republika; DMUP, Sbírka mikroorganismů, Katedra genetiky a mikrobiologie, PŘF UK, Praha, Česká republika; H. Sychrová, Fyziologický ústav, AV ČR, Praha, Česká republika; V. Plocek, PŘF UK, Praha; V. Šťovíček PŘF UK, Praha.

#### 4.1.2 POUŽITÉ PLAZMIDY

**Tab. 4.2.** Plazmidy použité pro disrupci genu *BUD2*, delecí genu *ADE2* a pro vložení indukovatelných promotorů *CUP1* a *GAL1*.

plazmid	aplikace	marker pro selekci v <i>S. cerevisiae</i>	zdroj / reference
FD58	disrupce genu <i>BUD2</i>	<i>LEU2</i>	F. Cvrčková *
pUG6	delece genu <i>ADE2</i>	<i>kanMX</i>	EUROSCARF (Gueldener <i>et al.</i> , 2002)
pYM-N2	vložení promotoru <i>CUP1</i>	<i>natNT2</i>	EUROSCARF (Janke <i>et al.</i> , 2004)
pYM-N23	vložení promotoru <i>GAL1</i>	<i>natNT2</i>	EUROSCARF (Janke <i>et al.</i> , 2004)

\* PŘF UK, Praha, Česká republika

Selekčním markerem pro buňky *E. coli* je u všech plazmidů ampicilinová rezistence Amp<sup>r</sup>.

#### 4.1.3 POUŽITÉ PRIMERY

**Tab. 4.3.** Seznam primerů použitých pro přípravu a ověření delečních kmenů a pro přípravu a ověření kmenů s vloženým indukovatelným promotorem.

primer	sekvence (5' → 3')	použití
BUD2 A (FW)	CATGTCTGATCTGGTGGAGC	ověřování disrupce genu <i>BUD2</i>
BUD2 B (RV)	CGGCAGGTCATTACTCGTTG	ověřování disrupce genu <i>BUD2</i>
LEU2 (RV)	AATCTGGAGCAGAACCGTGG	ověřování disrupce genu <i>BUD2</i>
ADE2delFW	CAATCAAGAAAAACAAGAAATCGGACAAA ACAATCAAGTcagctgaagcttcgtacgc	delece genu <i>ADE2</i>
ADE2delRV	ATAATTATTTGCTGTACAAGTATATCAATAA ACTTATATAgcataggccactagtggatctg	delece genu <i>ADE2</i>
ADE2verFW	CTTGACTAGCGCACTACC	ověřování delece <i>ADE2</i>
ADE2 verRV	AACGAAGTTACCTCTTCCATC	ověřování delece <i>ADE2</i>
ADE2verFW-2	TATGGCGGAATGTGAACAAAG	ověřování delece <i>ADE2</i>
ADE2verRV-2	GAAAAGGTTACACGGTACAG	ověřování delece <i>ADE2</i>
ADE1delFW	ATAAGCATTGCTTACAAAGAATACACATACG AAATATTAACGATACAGCTGAAGCTTCGTAC GC	delece genu <i>ADE1</i>
ADE1delRV	TCAGTGAGGAGTTACTGCGGACTTGTAG TATATGTAAATCACGGCATAGGCCACTAGTG GATCTG	delece genu <i>ADE1</i>
Ade1verFW	GCACTTGATCCATGTAGCCA	ověřování delece <i>ADE1</i>
Ade1verRV	TACTCTTTCCAAGCAGATCCG	ověřování delece <i>ADE1</i>
Ade1verRV-2	CAGGCCTTCCACTTTTGAAT	ověřování delece <i>ADE1</i>
Ade1verFW-2	GTGCATGGTTTGAAACAACCT	ověřování delece <i>ADE1</i>
kanFW	CTGATTGCCCGACATTATCG	ověřování delecí <i>ADE1</i> a <i>ADE2</i>
kanRV	GATACCAGGATCTTGCCATC	ověřování delecí <i>ADE1</i> a <i>ADE2</i>
ADE5,7-S1FW	TCTTAATCATAGCTTAAGAGAACCATTCTCC CTCCCCCTACAATGcgtacgtgcaggtcgac	vložení promotoru <i>CUP1</i> nebo <i>GAL1</i> před gen <i>ADE5,7</i>
ADE5,7-S4RV	CAAGAACGTGTTCTCTTGACCGTTTCCTAA AACGAGAATGTTGAGcatcgatgaattctctgtcg	vložení promotoru <i>CUP1</i> nebo <i>GAL1</i> před gen <i>ADE5,7</i>
ADE5,7verRV	CGGTGTTCAAGCCCTTGT	ověřování vložení promotoru před <i>ADE5,7</i>
ADE4-S1FW	GTTTAGCAAAGAAAGAGGTACAGCAAACAG CAGAATAGAAAAAATGcgtacgtgcaggtcgac	vložení promotoru <i>CUP1</i> před gen <i>ADE4</i>
ADE4-S4RV	TACTGGAGTGGTTTGGTTTGCTAATACAATA CCTAAAATACCACatcgatgaattctctgtcg	vložení promotoru <i>CUP1</i> před gen <i>ADE4</i>
ADE4verRV	TATTCCATCCAAGACACTGTCC	ověřování vložení promotoru před <i>ADE4</i>

#### 4.1.4 PŘÍSTROJE

---

(některé z použitých přístrojů)

mikroskop Carl Zeiss, Jena – objektivy 10x, 20x, 40x a imerzní objektiv 100x

mikromanipulátor Carl Zeiss, Jena

fluorescenční mikroskop Leica DMR - objektivy 5x, 10x, 20x, 40x a 100x (imerzní objektiv HCX PL fluotar 100x/1,3)

monochromatická kamera na mikroskop ProgRes MFcool (Jenoptik)

monochromatická CCD kamera na mikroskop (Cohu)

barevná kamera ProgRes CT3 (Jenoptik)

barevná kamera Hitachi HV-C20 s objektivy Cosmicar nebo Navitar

automatický mikrotom s vibrační čepelkou Leica VT1200 S

centrifuga s výkyvným rotorem Hettich Universal 320R

mikrocentrifuga Hettich Micro22R

analytické váhy Boeco BBI32

horkovzdušná třepačka Lab-Therm

NANODROP1000 spektrofotometr (Thermo Scientific)

PCR termocykler Bioer XP Cycler

pH-metr (Mettler Toledo)

termobox LBT168

#### 4.1.5 ROZTOKY

---

Vodné roztoky a živná média jsem připravovala z destilované vody upravené přístrojem Ultrapur (Watrex). Deionizovaná voda (demiH<sub>2</sub>O) byla připravena stejným přístrojem. Většina použitých chemikálií byla dodána od společnosti Lach-Ner. (Lachema), živné půdy, pepton pro bakteriologii, kvasničný autolyzát od společnosti Imuna Pharm, agar od Dr. Kulich Pharma. Další výrobce uvádím za názvem chemikálie. Všechny použité chemikálie byly v čistotě p.a.

##### 4.1.5.1 Jednoduché roztoky

3% alginát sodný	3 g alginátu sodného (Sigma) /100 ml H <sub>2</sub> O
300 mM amoniak:	2,2 ml/100 ml H <sub>2</sub> O
2,5% agaróza:	0,25 g agarózy (typ I-B, Sigma) rozvařeno v 10 ml H <sub>2</sub> O
1% BKP:	1 g BKP (bromkresolového purpuru; Sigma)/ 100 ml 96% etanolu
1 M CaCl <sub>2</sub> :	14,7 g CaCl <sub>2</sub> (Sigma) /100 ml H <sub>2</sub> O
5% CaCl <sub>2</sub> :	5 g CaCl <sub>2</sub> (Sigma) /100 ml H <sub>2</sub> O
0,5 M EDTA-NaOH:	18,6 g Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> EDTA (Chelaton 3; Sigma) /100 ml H <sub>2</sub> O (pH upravené pomocí 1 M NaOH podle potřeby)
1000x EtBr:	10 mg ethidium bromidu (Serva) /1 ml H <sub>2</sub> O
5% glukóza:	5 g glukózy/ 100 ml H <sub>2</sub> O

10% glycerol:	10 g glycerolu /100 ml demiH <sub>2</sub> O
1 M LiAc:	10,2 g CH <sub>3</sub> COOLi (Sigma) /100 ml H <sub>2</sub> O
300 mM metylamin:	2,27 ml metylaminu (Fluka)/100 ml H <sub>2</sub> O
3 M NaAc:	40,8 g CH <sub>3</sub> COONa /100 ml H <sub>2</sub> O
5 M NaCl:	29,25 g NaCl /100 ml H <sub>2</sub> O
1 M NaOH:	3,99 g NaOH /100 ml H <sub>2</sub> O
1 M NH <sub>4</sub> Cl	5,35 g NH <sub>4</sub> Cl /100 ml H <sub>2</sub> O
50% PEG	10 g PEG, doplnit H <sub>2</sub> O do 20 ml
10% SDS:	10 g dodecylsulfátu sodného (Serva) /100 ml H <sub>2</sub> O (před použitím zahřát)
1 M Tris-HCl:	12,1 g Tris (Sigma) /100 ml H <sub>2</sub> O (pH upravené pomocí HCl podle potřeby)
0,2% uracil	0,2 g uracilu (Sigma)/ 100 ml H <sub>2</sub> O

#### 4.1.5.2 Složené roztoky

BFM: (horizontální agarózová elektroforéza)  
50% glycerol, 0,13 M EDTA-NaOH (pH 8,0), 0,12% bromfenolová modř (Serva)

Coomassie blue - barvicí roztok:  
1,25 g Coomassie blue (Sigma), 200 ml metanolu, 50 ml kyseliny octové, 250 ml H<sub>2</sub>O

Coomassie blue - odbarvovací roztok:  
25 ml metanolu, 37,5 ml kyseliny octové, 437,5 ml H<sub>2</sub>O

PEG/TE/LiAc: (transformace kvasinek)  
40% PEG 3350 (Sigma), 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA-NaOH (pH 7,5),  
100 mM LiAc (Sigma)

TBE: 40 mM Tris, 2 mM EDTA, 90 mM kyselina boritá

TE: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA-NaOH (pH 8,0)

TE/LiAc: (transformace kvasinek)  
10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA-NaOH (pH 7,5), 100 mM LiAc (Sigma)

TRN: 1% RNáza (ribonukleáza A; Sigma), 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl  
roztok se zahřeje 15 minut na 100 °C, skladuje se při -20 °C

upravený chloroform:  
24 dílů chloroformu a 1 díl isoamylalkoholu

Wickerhamův roztok:

0,2 mg biotinu (Serva), 200 mg inositolu, 20 mg riboflavinu, 40 mg thiamin-HCl, 40 mg pyridoxinu-HCl, 20 mg p-aminobenzoové kyseliny, 40 mg pantothenátu vápenatého (Sigma), 40 mg kyseliny nikotinové, 0,2 mg kyseliny listové, 100 ml H<sub>2</sub>O

#### 4.1.6 KULTIVAČNÍ MÉDIA

---

##### 4.1.6.1 Pevná média

Fowellův agar: 0,5% KAc, 0,23% KCl, 2% agar  
(pH upravit pomocí 1 M KOH na 6,5 – 7,0)

GM: 1% kvasničný autolyzát (před sterilizací upravit pH na 5,0), 3% glycerol, 2% agar; na 1 l média přidat 10 ml 5% glukózy, 10 ml 0,2% uracilu, 10 ml 1 M CaCl<sub>2</sub>, 10 ml 96% etanolu  
jednotlivé složky média sterilizovat odděleně

GM-BKP: místo 10 ml 96% etanolu přidat 10 ml 1% BKP  
(výsledná koncentrace 0,01% BKP)

obměny GM média:  
změna koncentrace glycerolu na 0,5 % nebo 1 %  
přídavek (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (výsledná koncentrace 75mM)  
úprava pH na hodnotu 6,5 pomocí 1M NaOH

G-man: obměna GM média; místo 3 % glycerolu přidat 3 % manózy

MA (minimální médium):  
2% glukóza, 0,5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05% MgSO<sub>4</sub>, 0,1% Wickerhamův roztok, 2% agar  
jednotlivé složky média sterilizovat odděleně  
auxotrofním kmenům přidat příslušné aminokyseliny a dusíkaté báze

MA-BKP: obměna MA média; přidat 0,01% BKP

SD: 0,69% YNB bez aminokyselin a mědi (Formedium), 2% glukóza, demiH<sub>2</sub>O, 2% agar  
jednotlivé složky sterilizovat odděleně  
auxotrofním kmenům přidat příslušné aminokyseliny a dusíkaté báze

SDgal: obměna SD média; místo 2% glukózy přidat 2% galaktózu

SLAD: definované médium s nízkou koncentrací amonných iontů (Gimeno *et al.*, 1992); 0,67% YNB bez aminokyselin a síranu amonného (Difco), 2 % agar, 50  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

obměny SLAD média:

přídavky  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (výsledná koncentrace 7,6 mM, 37,9 mM nebo 75,7 mM)  
nebo přídavek  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (výsledná koncentrace 150 mM)

YEPG: 2% glukóza, 1% pepton, 0,5% kvasničný autolyzát, 2% agar

YEPG80ade: přídavek 80 mg adeninsulfátu/1l YEPG média

YEP10G: 10% glukóza, 1% pepton, 0,5% kvasničný autolyzát, 2 % agar

YEPgal: 2% galaktóza, 1% pepton, 0,5% kvasničný autolyzát, 2% agar

YEPgal80ade: přídavek 80 mg adeninsulfátu/1l YEPgal média

ŽA: 4% živný agar č. 2; do selekčních médií přidat ampicilin

#### 4.1.6.2 Tekutá média

skladovací médium pro bakterie: 2,5% živný bujón č. 2 (nebo SOC médium), 15% glycerol

skladovací médium pro kvasinky: 10% glukóza (sterilizovat odděleně), 60% glycerol (sterilizovat odděleně), 1% kvasničný autolyzát, 2% pepton

SD: 0,69% YNB bez aminokyselin a mědi (Formedium), 2% glukóza,  $\text{demiH}_2\text{O}$   
jednotlivé složky sterilizovat odděleně  
auxotrofním kmenům přidat příslušné aminokyseliny a dusíkaté báze

SD4ade: obměna SD média; přídavek 4 mg adeninsulfátu/1l SD média

SOC: 2% bactotrypton (Difco), 0,5% kvasničný autolyzát, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM glukóza, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgSO}_4$   
( $\text{MgCl}_2$  a  $\text{MgSO}_4$  sterilizovat odděleně)

TPN: (příprava kompetentních buněk pro elektroporaci)  
1% pepton, 1% bactotrypton (Difco), 0,5% kvasničný autolyzát, 0,5% NaCl

YEPG: 2% glukóza, 1% pepton, 0,5% kvasničný autolyzát

ŽB: 2,5% živný bujón č. 2; do selekčních médií přidat ampicilin

#### 4.1.6.3 Antibiotika, auxotrofní přídavky, pH indikátor

geneticin (G418; Duchefa Biochemie): 400 µg/ml média  
nourseothricin (Sigma): 100 µg/ml média  
ampicilin (Biotika): 50 µg/ml média  
L-leucin (Fluka), L-histidin (Fluka) a L-lysin (Fluka): auxotrofní přídavky pro kmeny odvozené od *S. cerevisiae* BY4742; 50 µg/ml média  
uracil (Sigma): auxotrofní přídavek pro kmeny odvozené od *S. cerevisiae* BY4742; 30 µg/ml média  
adeninsulfát (Amresco): auxotrofní přídavek pro kmeny *S. cerevisiae* s delecí *ade2*; 30 µg/ml média (červené zbarvení buněk) nebo 40 - 80 µg/ml média (běžné zbarvení)  
  
BKP (Sigma): bromkresolový purpur rozpuštěný v 96 % etanolu (10 mg/ml etanolu) konečná koncentrace v kultivačním médiu - 0,1 mg/ml média  
indikátor pH: fialová (pH ≥ 6,8), žlutá (pH ≤ 5,2)

#### 4.1.7 MATERIÁL PRO PRÁCI S DNA

---

1% agarózový gel: (horizontální agarózová elektroforéza)  
200 mg agarózy (Serva) rozvařeno ve 20 ml 0,5x TBE pufru  
restrikční enzymy a puřry (MBI Fermentas)  
hmotnostní markery a vzorková barva pro elektroforézu (MBI Fermentas)  
*salmon sperm* ssDNA (BioLabs) - sonikovaná DNA z lososího spermatu  
ribonukleáza A (Sigma)  
skleněné kuličky (425 – 600 µm, Sigma)  
PPP Master Mix (TopBio) - Taq DNA polymeráza a další komponenty pro PCR reakci

#### 4.1.8 OSTATNÍ

---

Calcofluor white M2R (Molecular Probes) - barví kvasinkové jizvy po pučení „šnekáza“ (PřF UK) – lyofilizovaný obsah trávicího traktu hlemýždě zahradního

## 4.2 METODY

---

### 4.2.1 STERILIZACE

---

Roztoky a média, špičky k mikropipetám, párátko a mikrozkušavky jsem sterilizovala vodní parou v autoklávu při tlaku 150 kPa po dobu 20 minut. Plastové centrifugační zkumavky, kyvety na elektroporaci a Petriho misky upravené pro indukci kolonií amoniakem a metylaminem, jsem sterilizovala 24 hodin parami Persterilu (30 % roztok kyseliny peroctové) v uzavřené nádobě. Skleněné předměty jsem sterilizovala suchým teplem při teplotě 160 °C po dobu minimálně 60 minut. Předměty krátkodobého a okamžitého použití (pinzety, hokejky, klička) jsem sterilizovala žíháním za sucha nebo po namočení v etanolu.

Všechny manipulace s buňkami určenými na další kultivaci jsem prováděla pouze se sterilním materiálem, a to v místnosti sterilizované UV zářením (UV box) nebo v horizontálním laminárním boxu (Telstar).

### 4.2.2 KULTIVACE MIKROORGANIZMŮ

---

#### 4.2.2.1 Kultivace v tekutém médiu

Kvasinky jsem kultivovala aerobně v horkovzdušné třepačce při 28 °C nejčastěji v komplexním YEPG médiu. Kultivaci kvasinek (nebo imobilizovaných kvasinek) za sníženého přístupu kyslíku, jsem prováděla staticky v termostatu; kvasinky byly kultivovány na dně zkumavky s médiem. Bakterie jsem kultivovala aerobně v horkovzdušné třepačce při 37 °C nejčastěji v živném bujónu (ŽB).

#### 4.2.2.2 Kultivace na pevném médiu

Kvasinky jsem kultivovala jako nátěr, monokolonie nebo jako obří kolonie (makrokolonie). Kultivace ve formě nátěru jsem dosáhla nanesením kultury pomocí mikrobiologické kličky nebo párátko. Nátěr na komplexním glukózovém médiu (YEPG) jsem nejčastěji používala na pomnožení kultury vyočkované z hlubokomrazáčního boxu.

Monokolonie jsou kolonie vzniklé z jediné buňky. Při rozsevu buněk na jednotlivé kolonie (monokolonie) jsem roztírala přibližně 100 µl vhodně naředěné suspenze buněk na povrchu agarů pomocí skleněné hokejky anebo nanášela dostatečně naředěnou buněčnou suspenzi jako kapku na vybrané místo na kultivační misce s živným médiem.

Obří kolonie vznikají, na rozdíl od monokolonií, z většího počtu buněk. Připravovala jsem je nanesením 5, 7 nebo 10 µl buněčné suspenze (přibližně  $10^8$  buněk/ml) na povrch živného média. Obří kolonie jsem kultivovala na Petriho miskách o průměru 9 cm, a to 1, 2, 3 nebo 6 kolonií ve středu misky. Vzdálenost mezi sousedními koloniemi byla vždy 1,5 cm.

Pro studium morfologie a diferenciaci jsem nejčastěji používala kolonie rostoucí na komplexním médiu s glycerolem (GM). Kvasinky jsem běžně kultivovala v termostatu při teplotě 28 °C. Kultivační teplotu 22 °C jsem použila, abych dosáhla výraznější morfologie kvasinkových kolonií.

Bakterie jsem kultivovala v termostatu při teplotě 37 °C na živném agaru (ŽA), a to ve formě nátěru nebo jako monokolonie.



#### 4.2.3 SKLADOVÁNÍ MIKROORGANIZMŮ

---

Kvasinky i bakterie jsem krátkodobě skladovala na pevném médiu v Petriho miskách při teplotě 4 °C. Pro dlouhodobé skladování jsem čerstvě narostlou kulturu resuspendovala v 1 ml příslušného komplexního skladovacího média a uložila v teplotě -80 °C.

#### 4.2.4 STANOVENÍ POČTU BUNĚK A OPTICKÉ DENZITY KULTURY

---

Koncentraci kvasinkových buněk v tekutém médiu nebo v buněčné suspenzi jsem stanovovala pomocí Thomovy počítací komůrky a mikroskopu. Optickou denzitu kultury jsem měřila na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm.

#### 4.2.5 KŘÍŽENÍ KVASINEK

---

Kultury dvou kmenů opačného párovacího typu jsem natřela na povrch YEPG média a inkubovala 24 hodin při 28 °C. Z narostlých buněk obou kmenů jsem připravila hustou suspenzi v destilované vodě a nanasla kapku suspenze každého z kmenů na totéž místo na YEPG půdě. Po inkubaci trvající 4 – 6 hodin při teplotě 28 °C jsem pod mikroskopem ověřila tvorbu zygot. Zygoty jsem izolovala mikromanipulací.

#### 4.2.6 SPORULACE

---

Kvasinkovou kulturu jsem natřela na povrch YEP10G média a kultivovala 24 hodin při 28 °C. Z nátěru jsem připravila velmi hustou suspenzi v destilované vodě a rozetřela ji na povrch Fowellova agaru. Buňky jsem inkubovala 3 - 10 dní při laboratorní teplotě. Přítomnost věcek jsem kontrolovala pod mikroskopem. Separaci jednotlivých věcek a spor jsem provedla mikromanipulací.

Pro úspěšnou izolaci spor je nutné před mikromanipulací natrávit stěnu věcek roztokem „šnekázy“. Připravila jsem tedy hustou suspenzi sporulující kultury v 50 µl 3% roztoku „šnekázy“ a inkubovala ji 15 -20 minut. Působení „šnekázy“ jsem ukončila naředěním suspenze 200 µl destilované vody.

#### 4.2.7 MIKROMANIPULACE

---

Nejprve jsem si připravila sterilní sklíčka s agarovou půdou. Na spodní straně krycího sklíčka jsem lihovým popisovačem udělala několik orientačních bodů a sklíčko umístila v Petriho misce s agarovou půdou. Sklo jsem potom rovnoměrně pokryla komplexní agarovou půdou. Před použitím jsem odkrojila agar na krajích sklíčka.

K přípravě mikromanipulačních jehel jsem použila skleněné tyčinky o průměru přibližně 3 mm. Na koncích tyčinek jsem nad lihovým kahanem vytvořila velmi jemnou jehlu svírající s tyčinkou úhel asi 45°.

Do etanolem vysterilizované mikromanipulační komůrky jsem umístila sklo s agarovou půdou a suspenzí kvasinkových buněk nanesenou podél jedné strany agaru na sklíčku. Komůrku jsem vložila do mikromanipulačního zařízení. Při vlastní mikromanipulaci jsem pomocí mikromanipulační jehly přemísťovala jednotlivé zygoty, věcka nebo spory po sklíčku s agarem. Polohu takto oddělených buněk jsem určila pomocí teček nakreslených na spodní straně sklíčka. Po skončení mikromanipulace jsem agar ze sklíčka přenesla na agarovou půdu v Petriho misce a misku umístila do termostatu s teplotou 28 °C.

#### 4.2.8 STANOVENÍ TYPU PUČENÍ

Typ pučení u kvasinkových buněk z tekuté kultury nebo u buněk odebraných z kvasinkových kolonií jsem určovala podle uspořádání buněk v klastrech. V případě potřeby (např. u kultur netvořících buněčné klastry) jsem u buněk obarvila jizvy po pučení. Buňky jsem resuspendovala v 30  $\mu$ l 2  $\mu$ M roztoku fluorescenčního barviva Calcofluor White M2R, dvakrát je omyla v deionizované vodě a pomocí mikroskopu stanovila typ pučení podle lokalizace jizev na povrchu buněk. Vyhodnocovala jsem pouze buňky, které neměly více než 6 jizev. Při každém stanovení typu pučení jsem hodnotila 70-360 buněk.

Výskyt pseudohyálních buněk na okrajích mikrokolonií jsem sledovala *in situ*. Přítomnost těchto buněk uvnitř „vrásčitých“ kolonií jsem vyhodnotila u buněk odebraných z kolonií.

#### 4.2.9 BARVENÍ INVAZIVNĚ ROSTOUCÍCH KOLONIÍ

Kvasinkové kolonie jsem mírným proudem vody smyla z povrchu živného média. Agarové médium jsem potom přelila roztokem Coomassie blue a 1 hodinu barvila buňky, které zůstaly zarostlé v médiu. Po odstranění roztoku barviva jsem agarové médium několikrát opláchla vodou a potom ho odbarvila odbarvovacím roztokem.

#### 4.2.10 TEST ADHEZIVITY BUNĚK

Buňky z kvasinkových kolonií jsem resuspendovala ve vodě (výsledná koncentrace  $1-4 \times 10^8$  buněk/ml), zcentrifugovala, dvakrát omyla v 5 ml vody nebo 0,25 M EDTA (s intenzivním mícháním 30 s) a resuspendovala ve 2 ml 0,25 M EDTA. Pod mikroskopem jsem sledovala výskyt jednotlivých buněk, buněčných klastrů a buněčných agregátů. Metoda upravena podle Stratford *et al.* (1988).

#### 4.2.11 PŘÍPRAVA TENKÝCH ŘEZŮ Z OBŘÍCH KOLONIÍ

Z obřích kvasinkových kolonií jsem připravovala vertikální řezy pomocí automatického mikrotomu s vibrační čepelkou Leica VT1200 S.

Kolonii jsem skalpelem vyřízla s částí okolního živného média a přenesla ji do plastové komůrky (přibližně 2x2x1 cm). Kolonii jsem přelila 0,25% agarózou (typ I-B; Sigma) a vytvořila na povrchu kolonie vrstvu přibližně 2-3 mm silnou. Agarózu jsem nechala 20-30 minut ztuhnout. Potom jsem vyjmula bloček z komůrky a kolonii rozřízla žiletkou. Řez jsem vedla středem kolonie kolmo na živné médium. Jednu polovinu bločku jsem přilepila vteřinovým lepidlem na kovovou destičku tak, aby čerstvý řez kolonií byl umístěn horizontálně a nahoře. Destičku s bločkem jsem umístila do kovové nádoby v mikrotomu, zalila destilovanou vodou, aby byl bloček celý potopený, a nastavila na přístroji požadovanou tloušťku řezu (20  $\mu$ m nebo 50  $\mu$ m). Z řezů jsem připravila mikroskopické preparáty.

Pokud jsem sledovala tvorbu červeného ade pigmentu uvnitř kolonií, připravovala jsem kromě výše popsaných čerstvých řezů také řezy, na které 1 hodinu působil vzdušný kyslík. Z nádoby mikrotomu jsem odčerpala vodu a inkubovala bloček s kolonií 1 hodinu. Poté jsem nádobku doplnila vodou a připravila řez.

Pokud jsem sledovala účinek indukce metylaminem na kolonii, vedla jsem vertikální řezy středem kolonie a rovnoběžně se směrem působení metylaminu.

#### 4.2.12 PŘÍPRAVA ALGINÁTOVÝCH KULIČEK

Buněčnou kulturu jsem kultivovala v tekutém YEPG80ade médiu do stacionární fáze. 0,8 ml této kultury jsem smíchala s 20 ml 3% alginátu sodného. Suspenzi jsem nabrala pipetovací špičkou (špička pro objem 200 - 1000  $\mu$ l) a nechala ji odkapávat do 5% roztoku  $\text{CaCl}_2$ . Z jednoho

ml suspenze jsem tímto způsobem připravila 23 - 25 alginátových kuliček. Kuličky jsem nechala 30 minut tuhnout při 4 °C. Poté jsem je dvakrát opláchla sterilní deionizovanou vodou. Alginátové kuličky jsem potom 36 - 40 hodin kultivovala v tekutém YEPG80ade médiu, přičemž došlo k pomnožení imobilizovaných kvasinkových buněk (tzv. předkultivace). Předkultivované alginátové kuličky jsem dvakrát opláchla sterilní deionizovanou vodou a uložila je ve sterilní deionizované vodě ve 4 °C.

#### 4.2.13 SVĚTELNÁ A FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

Buňky a tenké řezy kolonií jsem pozorovala ve fluorescenčním mikroskopu Leica DMR s objektivy 5x, 10x, 20x, 40x a 100x (imerzní objektiv HCX PL fluotar 100x/1,3). Zelenou fluorescenci v buňkách s GFP jsem pozorovala pomocí fluorescenční kostky GFP (BP 470/40, BP 525/50) a kostky I3 (BP 450-490, LP 515), buňky obarvené barvivem Calcofluor White M2R jsem sledovala pomocí kostky A (BP 340-380, LP 425), buňky s ade pigmentem pomocí kostky N2.1 (BP 515-560, LP 590). Buňky obarvené bromkresolovým purpurem oranžově fluoreskovaly při použití kostky I3. Morfologii buněk jsem sledovala při použití Nomarského kontrastu.

#### 4.2.14 FOTOGRAFOVÁNÍ KVASINKOVÝCH KOLONIÍ A BUNĚK

Kolonie a alginátové kuličky jsem fotografovala pomocí barevné kamery ProgRes CT3 nebo Hitachi HV-C20 s objektivy Cosmicar nebo Navitar a zobrazovacích programů Lucia G/F software (Laboratory Imaging) nebo NIS-Elements AR 2.30 (Laboratory Imaging). Jako osvětlovací zařízení jsem používala Fiber-Lite PL-800 a Kaiser. Při fotografování invazivního růstu jsem kultivační misky prosvětlovala zespodu pomocí zařízení Kaiser Prolite.

Buňky a řezy kolonií jsem snímala pomocí monochromatické kamery (CCD kamera Cohu nebo ProgRes MFcool) umístěné na mikroskopu Leica DMR s objektivy 5x, 10x, 20x, 40x a 100x (imerzní objektiv HCX PL fluotar 100x/1,3).

#### 4.2.15 INDUKCE KOLONIÍ PLYNNÝMI AMINY

Při indukci alkalizace pomocí plyných aminů jsem indukovala obří kolonie různého stáří rostoucí na GM-BKP médiu. Kultivační Petriho misku s kvasinkovou kolonií jsem otočila víčkem dolů. Do víčka jsem umístila malou mističku tak, aby byla vzdálená 1,5 cm od kolonie. Do malé mističky jsem nanesla 100 µl 300mM roztoku metylaminu (nebo 300 mM roztoku amoniaku) a nechala jej působit 5 - 30 minut. Potom jsem víčko s mističkou odstranila (obr. 5.16 v kapitole výsledky a diskuze).

Při indukci dimorfního přepnutí na pseudohyfální růst jsem indukovala monokolonie rostoucí na GM médiu 1 hodinu po zaočkování. Do mističky umístěné ve víčku Petriho misky jsem umístila 70 mg NH<sub>4</sub>Cl a 70 µl 1 M NaOH (Palková *et al.*, 1997). Vznikající amoniak jsem nechala 15 minut působit na monokolonie z různých vzdáleností (1 cm a 3 cm; obr. 5.9 v kapitole výsledky a diskuze). Monokolonie jsem indukovala rovněž 1 M metylaminem a 1 M propylaminem (připravené ze zásobních 12 M roztoků, Sigma).

#### 4.2.16 PŘERUŠENÍ GENU *BUD2*

Pro disrupci genu *BUD2* u kvasinkových kmenů jsem použila vektor FD58. FD58 je plazmid odvozený od plazmidu pUC19. Nese přerušovaný gen *BUD2* (fragment BamH1-Pst1 o velikosti 4,9 kb), u něhož byla většina kódující sekvence (interní fragment Bgl2) nahrazena genem *LEU2*.

Z vektoru FD58 jsem pomocí restriktáz BamHI a PstI vyštěpila disrupční alelu. Fragment jsem izolovala z agarózového gelu a použila pro transformaci kvasinek. Transformanty jsem selektovala na minimálním médiu s přísadkou esenciálních aminokyselin s výjimkou leucinu. U

vybraných transformantů jsem pomocí PCR ověřila, že došlo k přerušení genu *BUD2*. Použité primery jsou uvedeny v tabulce 4.3.

#### 4.2.17 DELECE GENU *ADE2* A *ADE1*

Gen *ADE2* jsem deletovala pomocí Cre/loxP systému (Gueldener *et al.*, 2002). Pomocí PCR jsem z plazmidu pUG6 amplifikovala deleční kazetu nesoucí selekční marker *kanMX* zajišťující rezistenci ke geneticinu. Deleční kazetu jsem použila pro transformaci kvasinek *S. cerevisiae* BY4742. Transformanty jsem selektovala na komplexním médiu s geneticinem. U vybraných transformantů jsem pomocí PCR ověřila, že došlo k deleci genu *ADE2*. Stejným způsobem jsem připravila jiné kmeny s delecí genu *ADE1*. Použité primery jsou uvedeny v tabulce 4.3.

#### 4.2.18 VLOŽENÍ PROMOTORŮ *CUP1* A *GAL1*

Indukovatelný promotor *CUP1* (nebo *GAL1*) jsem vložila do genomu *S. cerevisiae* BS před gen *ADE5,7* pomocí plazmidu pYM-N2 (nebo pYM-N23; Janke *et al.*, 2004). Z plazmidu pYM-N2 jsem pomocí PCR amplifikovala kazetu nesoucí selekční marker *natNT2* a promotor *CUP1*. Kazetu *natNT2*-P<sub>CUP1</sub> jsem transformovala do kvasinek a transformanty s vloženým promotorem *CUP1* selektovala na komplexním médiu s nourseothricinem. Obdobně jsem z plazmidu pYM-N23 amplifikovala kazetu *natNT2*-P<sub>GAL1</sub>. Po transformaci do kvasinek jsem na komplexním médiu s nourseothricinem selektovala klony s vloženým promotorem *GAL1*. U vybraných transformantů jsem pomocí PCR ověřila, že byl promotor (P<sub>CUP1</sub> nebo P<sub>GAL1</sub>) vložen na správné místo v genomu. Bezchybné vložení promotoru P<sub>CUP1</sub> jsem nechala ověřit sekvenováním. Obdobným způsobem jsem připravila další kmen s promotorem *CUP1* vloženým před gen *ADE4*. Použité primery jsou uvedeny v tabulce 4.3.

#### 4.2.19 DALŠÍ POUŽITÉ METODY

Transformace bakterie *E. coli* - elektroporace  
Transformace *S. cerevisiae* - LiAc/ssDNA/PEG metoda (Gietz a Woods, 2002)  
Izolace plazmidové DNA z *E. coli*  
Izolace chromozomální DNA z *S. cerevisiae*  
Restrikční štěpení  
PCR  
Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu  
Izolace DNA z agarózového gelu

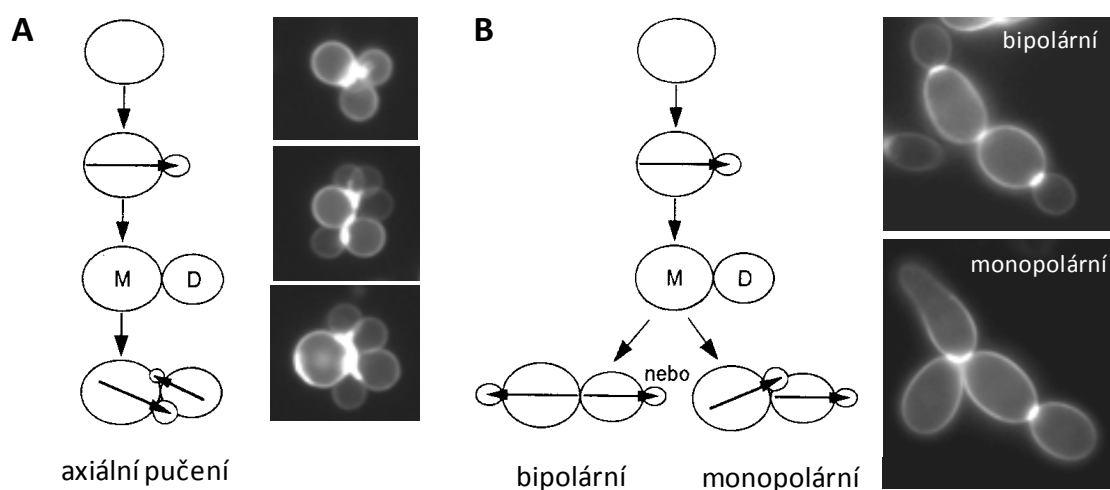
#### 4.2.20 SEZNAM DALŠÍCH OSVOJENÝCH METOD

(metody, které nebyly použity pro účely této práce)  
Frakcionace buněk na sacharózovém gradientu  
*Western blot* analýza  
Stanovení množství amoniaku pomocí Nesslerova činidla  
Barvení kvasinkových kolonií *in situ*  
Přenášení kvasinkových kolonií na jiné živné médium

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 VLIV TYPU PUČENÍ A BUNĚČNÉ ADHEZE NA MORFOLOGII KOLONIÍ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

V první části své experimentální práce jsem zjišťovala, zda morfologicky odlišné části kolonií kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* nejsou tvořeny buňkami lišícími se typem pučení. Pokud totiž při kultivaci zůstávají mateřské a dceřiné buňky v kontaktu, jako například u kmenů tvořících v tekutém médiu shluky nebo u kultur rostoucích na pevném médiu, potom prostorová orientace vznikajících pupenů ovlivňuje tvar vznikajícího shluku či kolonie. U kvasinek rozlišujeme několik typů pučení: axiální (obr. 5.1A), polární (monopolární a bipolární; obr. 5.1B) a nakonec náhodné, kdy pupeny na buňce vznikají na zcela náhodných místech. Shluky a mladé mikrokolonie tvořené kvasinkami pučícími monopolárně se rozrůstají spíše do plochy než do výšky. Shluky a mladé mikrokolonie kvasinek pučících axiálně se do plochy příliš nerozrůstají, zato jsou vyšší.



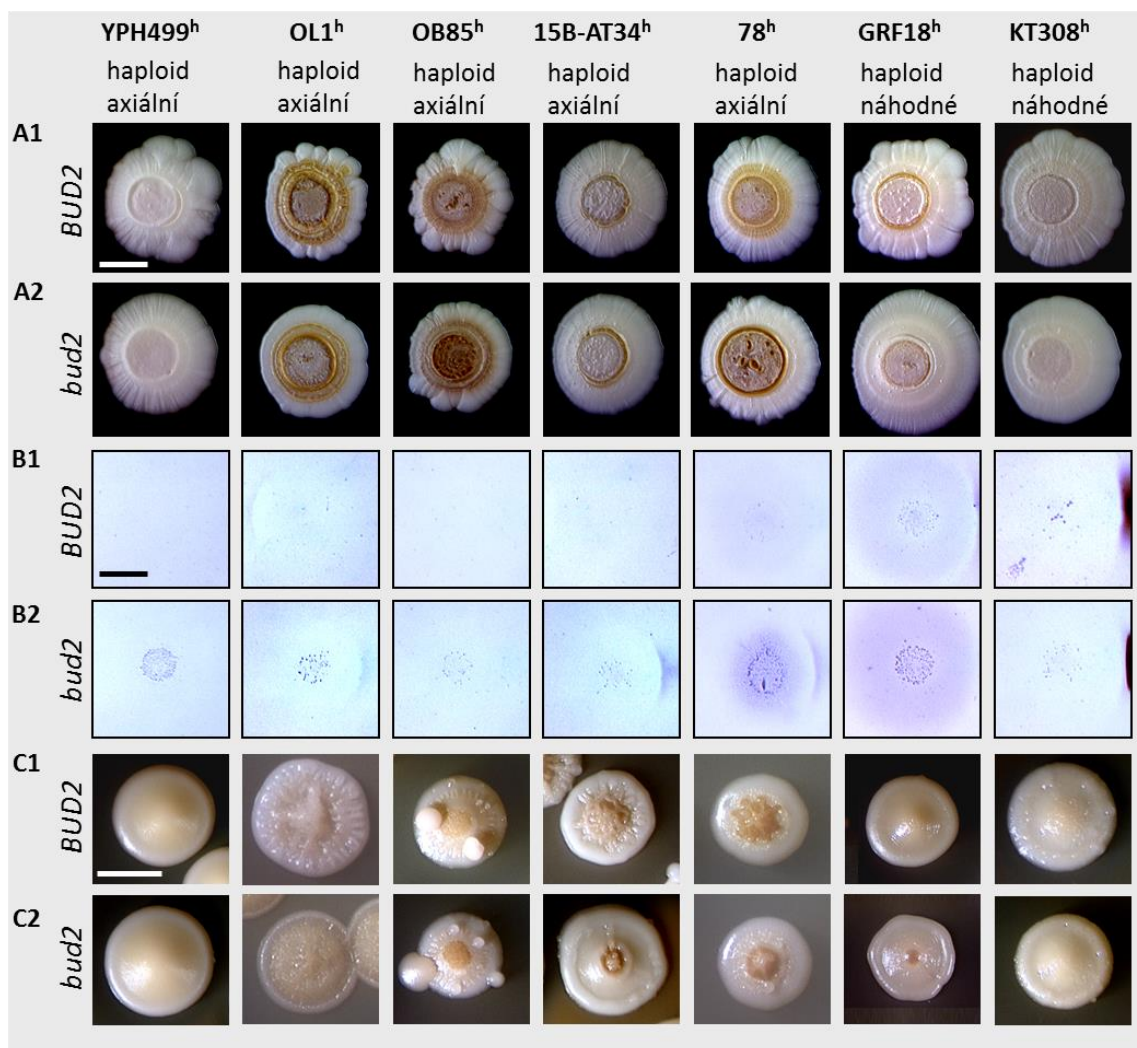
**Obr. 5.1.** A) Axiální pučení. Při axiálním pučení vznikají nové pupeny na dceřiné buňce v blízkosti místa původního spojení s mateřskou buňkou, tj. v blízkosti jizvy zrodu na pólu zrodu. Mateřská buňka znovu pučí těsně vedle předešlého dceřiného pupenu. Pokud se nově vznikající pupeny od mateřské a dceřiné buňky neoddělují, vzniká v místě kontaktu těchto dvou buněk shluk nových buněk. B) Polární pučení. Při polárním pučení pučí dceřiná buňka nejprve na volném pólu, tj. na protilehlém pólu oproti pólu zrodu. Další pupeny se tvoří opět na tomto pólu (monopolární pučení) nebo na pólu opačném, než vypučela poslední dceřiná buňka (bipolární pučení). Buňky na fotografiích mají obarvené jizvy po pučení fluorescenčním barvivem calcofluorem. M - mateřská buňka, D - dceřiná buňka. (Upraveno podle Chant, 1996).



### 5.1.1 MORFOLOGIE OBŘÍCH KOLONIÍ A MONOKOLONIÍ

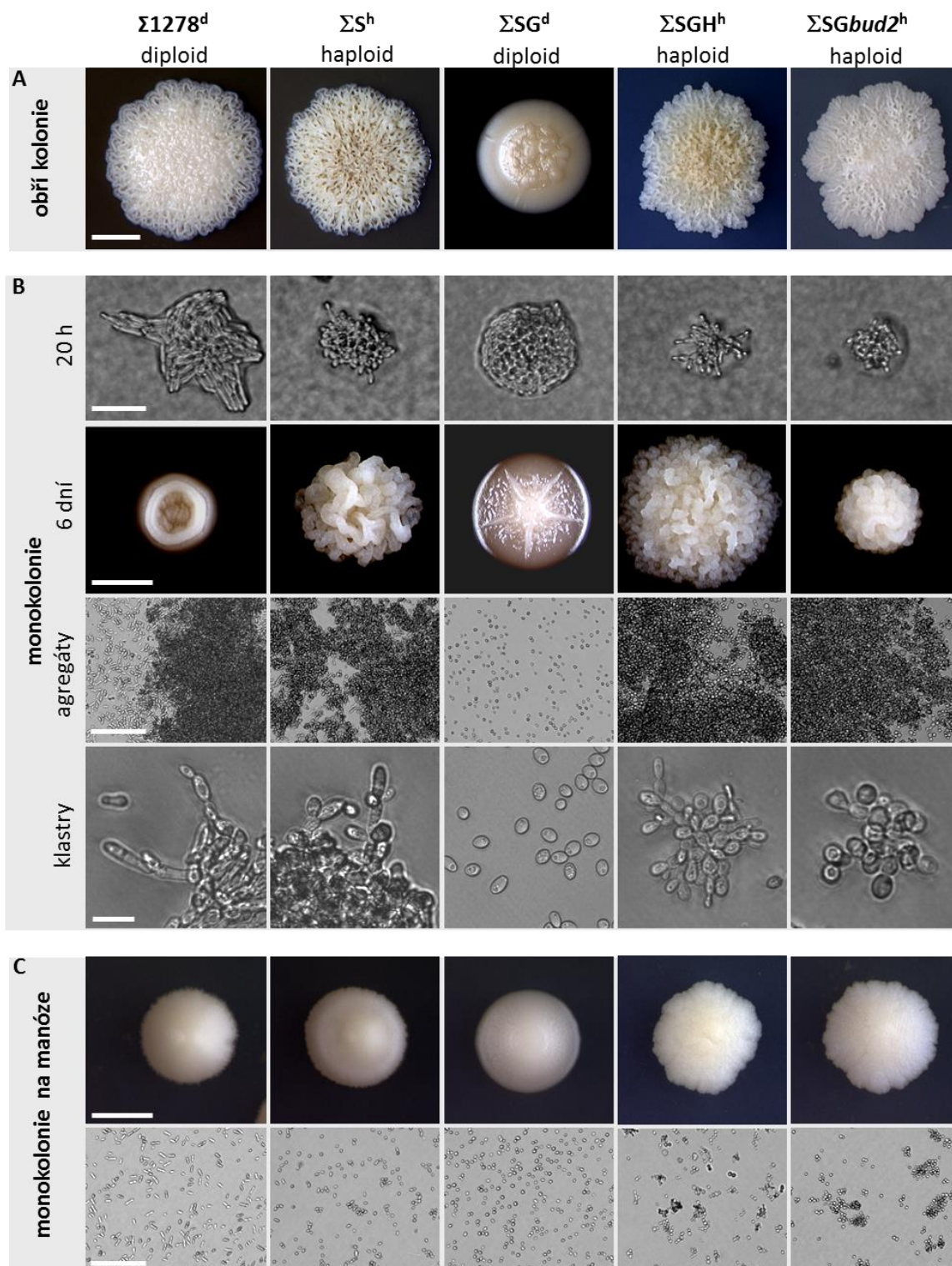
Vliv typu pučení na morfologii kolonií (obřích kolonií i monokolonií) jsem testovala na několika běžných laboratorních kmenech *S. cerevisiae* (některé z nich jsou na obr. 5.2A1,C1) a na kmenech odvozených od kmene  $\Sigma 1278b$  (obr. 5.3A,B). Použila jsem haploidní i diploidní kmeny. Monokolonie (vznikající z jediné buňky) i obří kolonie (rostoucí z kapky buněčné suspenze o objemu 7  $\mu$ l) jsem kultivovala na komplexním médiu s glycerolem (GM médium), protože na médiu s nezkrasitelným zdrojem uhlíku jsou kolonie více strukturované než na živném médiu s glukózou.

Kmeny s genetickým pozadím  $\Sigma 1278b$  rostoucí na GM médiu se vyznačují velmi výraznou morfologií kolonií, vytvářejí typické „vrásčité“ kolonie (Granek a Magwene, 2010). Běžné laboratorní kmeny nevytvářejí příliš strukturované kolonie, mnoho z nich tvoří kolonie hladké. Pro svou studii jsem vybrala ty kmeny, jejichž kolonie byly alespoň mírně strukturované, tj. vytvářely středový vyvýšený prstencový val (přibližně ohraničuje oblast původní inokulace), radiální rýhy či sektory. Vzhledem k tomu, že při kultivaci při nižší teplotě jsou kolonie více strukturované, zvolila jsem jako kultivační teplotu nejen obvyklých 28 °C, ale v některých případech 22 °C.



**Obr. 5.2.** Morfologie kolonií a zarůstání do agaru haploidních kmenů *S. cerevisiae* rostoucích na GM médiu. A) Obří kolonie kultivované 31 dní při 22 °C; měřítko 5mm. B) Detekce invazivního růstu obřích

kolonií po 22 dnech (u kmene 78<sup>h</sup> po 36 dnech) kultivace při 28 °C; měřítko 5mm. C) Monokolonie (100-140 kolonií na misku) kultivované 24 dní při 28 °C; měřítko 2 mm. *BUD2* - rodičovské kmeny; *bud2* - kmeny s přerušeným genem *BUD2*.



**Obr. 5.3.** Morfologie kolonií a tvorba buněčných klastrů haploidních a diploidních kmenů *S. cerevisiae* s genetickým pozadím  $\Sigma 1278b$ . A) Obří kolonie kultivované 13 dní na GM médiu při 28 °C; měřítko 5 mm. B) Monokolonie rostoucí v počtu 2 - 8 na misku 20 hodin (měřítko 30  $\mu$ m) nebo 6 dní (měřítko 2 mm) na GM médiu. Buněčné agregáty (měřítko 100  $\mu$ m) a buněčné klastry (shluky nedokonalé

oddělených mateřských a dceřiných buněk; měřítko 10  $\mu$ m) pocházejí z šestidenních monoklonií. C) Monoklonie rostoucí 6 dní na komplexním médiu s manózou (médiu G-man; měřítko 2 mm) a buňky odebrané z těchto kolonií (měřítko 100  $\mu$ m).

### 5.1.2 PŘÍPRAVA NOVÝCH KMENŮ

---

Kromě dostupných sbírkových kmenů jsem použila i nově připravené kmeny. Křížením haploidních kmenů a sporulací diploidních kmenů jsem připravila 6 nových haploidních a diploidních kmenů odvozených od rodičovských laboratorních kmenů  $\Sigma 1278^d$ , GRF18<sup>h</sup> and P23-23<sup>d</sup>. Dále jsem společně s kolegyní Martou Hůlkovou provedla přerušení genu *BUD2* (viz kapitola 4.2.16) u 10 haploidních kmenů (YPH499<sup>h</sup>, OL1<sup>h</sup>, OB85<sup>h</sup>, 15B-AT34<sup>h</sup>, 78<sup>h</sup>, GRF18<sup>h</sup>, KT308<sup>h</sup>, P1<sup>h</sup>, P2<sup>h</sup>,  $\Sigma$ SGH<sup>h</sup>). Diploidní kmen *PDbud2<sup>d</sup>* (homozygotní *bud2*) jsem získala křížením haploidních kmenů P1*bud2<sup>h</sup>* a P2*bud2<sup>h</sup>*.

### 5.1.3 PUČENÍ V TEKUTÉM MÉDIU

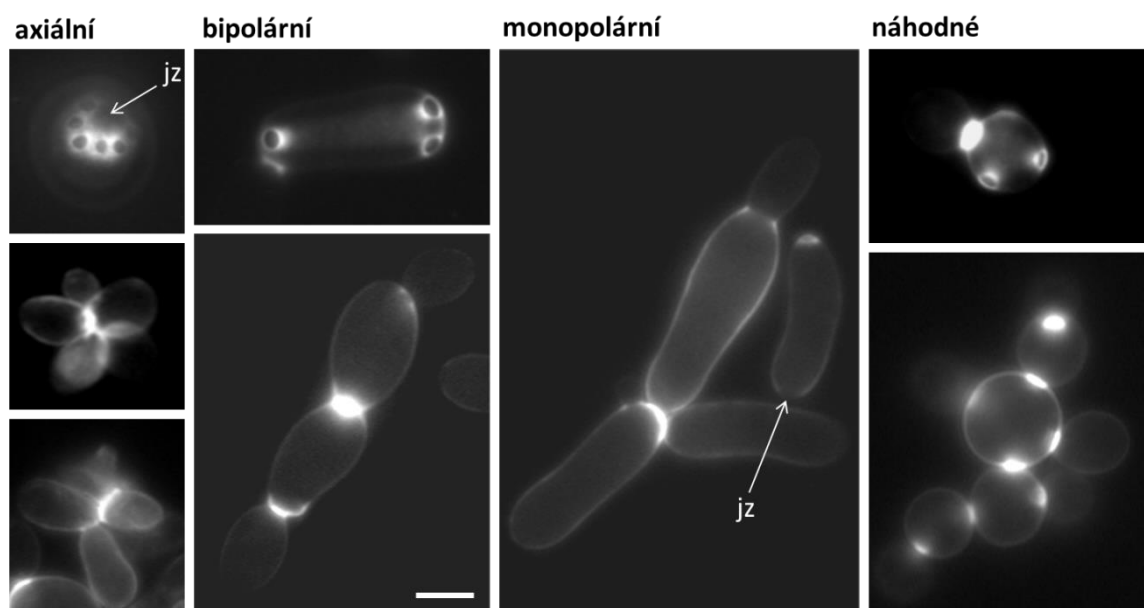
---

Polarita pučení a tedy i prostorová orientace vznikajících pupenů souvisí s ploidií buněk. Haploidní buňky párovacího typu *a* nebo  $\alpha$  rostoucí exponenciálně v tekutém médiu s glukózou by měly pučet axiálně. Diploidní buňky (*a/a*) by za stejných podmínek měly pučet polárně (Hicks *et al.* 1977).

U 9 sbírkových a 17 nově připravených kmenů jsem ověřovala, zda jejich typ pučení v tekutém médiu s glukózou (YEPG) odpovídá literárním údajům. Buňky v exponenciální fázi růstu jsem barvila fluorescenčním barvivem calcofluorem, které výrazně barví kvasinkové jizvy, tj. místa, kde došlo k oddělení pupenu od mateřské buňky. Tímto způsobem je možné, podle charakteristického rozmístění jizev po pučení na povrchu buněk, snadno rozpoznat buňky pučící axiálně, monopolárně či bipolárně. Pokud dceřiné buňky zůstávají spojené s mateřskými buňkami (tvoří tzv. klastry), je možné stanovit typ pučení podle rozmístění dceřiných buněk (obr. 5.4).

V tabulce 5.1 jsou uvedeny výsledky pro kmeny s neporušeným genem *BUD2*. Pouze 7 z 11 haploidních kmenů pučelo opravdu axiálně. U dvou haploidních kmenů (GRF18<sup>h</sup> a KT308<sup>h</sup>) jsem zjistila nestandardní typ pučení. Axiálně pučel pouze menší podíl buněk; v kultuře převažovaly buňky pučící polárně nebo náhodně (s náhodně rozmístěnými jizvami). Dva haploidní kmeny odvozené od kmene  $\Sigma 1278^d$  ( $\Sigma S^h$  a  $\Sigma SGH^h$ ) měly buňky spojené v klastrech (shluk několika buněk, u kterých nedošlo k oddělení mateřských a dceřiných buněk). V centrální části těchto klastrů buňky pučely axiálně, zatímco na okraji klastrů docházelo k protahování buněk a přepnutí na monopolární pučení. Diploidní kmeny pučely převážně polárně. Většina buněk kmene  $\Sigma 1278^d$  tvořila malé klastry.





**Obr. 5.4.** Stanovení typu pučení u buněk s obarvenými jizvami po pučení (barvení calcofluorem). Pokud se dceřiné buňky oddělují od mateřských (netvoří se klastry), je možné stanovit typ pučení pomocí lokalizace jizev po pučení. Pro správné odlišení axiálně a monopolárně pučících buněk je nutné na mateřské buňce identifikovat jizvu zrodu (místo, kterým byla mateřská buňka napojena na svou mateřskou buňku). U axiálně pučících buněk se jizva zrodu vyskytuje v blízkosti jizev po dceřiných buňkách. U monopolárně pučících buněk se jizva zrodu vyskytuje vždy na pólu opačném. Jizva zrodu má jiný tvar, nebarví se calcofluorem a bývá větší než dceřiné jizvy. jz - jizva zrodu. Měřítka 3  $\mu\text{m}$ .

Kmen	Barvení jizev po pučení					Typ pučení
	PI	A%	P%	R%	N	
YPH499 <sup>h</sup>	n	100	0	0	94	axiální
OL1 <sup>h</sup>	n	98	2	0	89	axiální
OB85 <sup>h</sup>	n	97	3	0	100	axiální
15B-AT34 <sup>h</sup>	n	95	4	1	211	axiální
78 <sup>h</sup>	n	90	7	3	108	axiální
GRF18 <sup>h</sup>	n	31	25*	44	354	náhodné
KT308 <sup>h</sup>	n	25	50*	25	361	náhodné
P23-23 <sup>d</sup>	2n	0	95	5	104	polární
$\Sigma$ 1278 <sup>d</sup>	2n	0	99	1	216	polární §
$\Sigma$ S <sup>h</sup>	n	89	10	1	113	axiální nebo monopolární
$\Sigma$ SG <sup>d</sup>	2n	0	96	4	103	polární
$\Sigma$ SGH <sup>h</sup>	n	ND	ND	ND		monopolární nebo axiální
P1 <sup>h</sup>	n	98	2	0	70	axiální
P2 <sup>h</sup>	n	97	3	0	77	axiální
PD <sup>d</sup>	2n	0	87	13	183	polární #

**Tab. 5.1.** Typ pučení u kmenů *S. cerevisiae* v tekutém YEPG médiu. PI - ploidie; A - axiálně pučící buňky; P - polárně pučící buňky; R - náhodně pučící buňky; N - celkový počet buněk; ND - nestanoveno kvůli přílišné velikosti buněčných klastrů; § převážně monopolární; # převážně bipolární; \*rozlišení polárního a náhodného pučení bylo obtížné kvůli téměř kulatému tvaru buněk.

Stejným způsobem jsem ověřovala typ pučení u 11 kmenů s delecí genu *BUD2*. Protože gen *BUD2* je jedním z genů zodpovědných za správnou lokalizaci pupenu, kmeny s delecí tohoto genu by měly pučet náhodně (viz kapitola 3.1.6). Ověřila jsem, že homozygotní diploid *PDbud2<sup>d</sup>* (*bud2/bud2*) i všechny haploidní *bud2* kmeny opravdu pučely náhodně (tab. 5.2).

Kmen	PI	Barvení jizev po pučení				Typ pučení
		A%	P%	R%	N	
YPH499 <i>bud2<sup>h</sup></i>	n	0	0	100	60	náhodné
OL1 <i>bud2<sup>h</sup></i>	n	0	0	100	70	náhodné
OB85 <i>bud2<sup>h</sup></i>	n	0	0	100	76	náhodné
15B-AT34 <i>bud2<sup>h</sup></i>	n	0	0	100	60	náhodné
78 <i>bud2<sup>h</sup></i>	n	0	1	99	74	náhodné
GRF18 <i>bud2<sup>h</sup></i>	n	0	2	98	47	náhodné
KT308 <i>bud2<sup>h</sup></i>	n	6	0	94	170	náhodné
ΣSGH <i>bud2<sup>h</sup></i>	n	ND	ND	ND		náhodné
P1 <i>bud2<sup>h</sup></i>	n	0	0	100	55	náhodné
P2 <i>bud2<sup>h</sup></i>	n	0	0	100	49	náhodné
PD <i>bud2<sup>d</sup></i>	2n	0	9	91	213	náhodné

**Tab. 5.2.** Typ pučení u kmenů *S. cerevisiae* s delecí genu *BUD2* v tekutém YEPG médiu. PI - ploidie; A - axiálně pučící buňky; P - polárně pučící buňky; R - náhodně pučící buňky; N - celkový počet buněk; ND - nestanoveno kvůli přílišné velikosti buněčných klastrů.

#### 5.1.4 VLIV TYPU PUČENÍ NA MORFOLOGII KVASINKOVÝCH KOLONIÍ

Zjišťovala jsem, zda dochází k přepínání typu pučení během vývoje kolonií a zda se liší typ pučení v různých částech kolonií. Pro testování typu pučení v kvasinkových koloniích jsem použila 3 haploidní kmeny, pučící v tekutém médiu axiálně a tvořící mírně strukturované kolonie (OL1<sup>h</sup>, 15B-AT34<sup>h</sup>, 78<sup>h</sup>), a 3 diploidní kmeny, pučící v tekutém médiu polárně a tvořící silně strukturované (Σ1278<sup>d</sup>), mírně strukturované (ΣSG<sup>d</sup>) a hladké (PD<sup>d</sup>) kolonie. Kmeny jsem kultivovala jako obří kolonie a monokolonie na komplexním médiu s glycerolem (GM). Po 5 dnech a po 26 dnech jsem odebrala buňky monokoloní a buňky z okrajové a středové části obří kolonie (u haploidních kmenů z oblasti středového valu) a pomocí barvení calcofluorem jsem stanovila typ pučení (tab. 5.3).

#### A) obří kolonie

Kmen		okraj kolonie				středová část			
	PI	A (%)	P (%)	R (%)	N	A (%)	P (%)	R (%)	N
OL1 <sup>h</sup>	n	61	36	3	297	61	23	16	201
15B-AT34 <sup>h</sup>	n	74	19	7	355	36	36	28	248
78 <sup>h</sup>	n	88	11	1	316	59	35	6	183
PD <sup>d</sup>	2n	0	76	24	232	0	64	36	235
ΣSG <sup>d</sup>	2n	0	97	3	275	0	76	24	221
Σ1278 <sup>d</sup>	2n	0	99	1	252	0	90	10	151

#### B) monokolonie

Kmen	PI	A (%)	P (%)	R (%)	N
OL1 <sup>h</sup>	n	57	31	12	178
15B-AT34 <sup>h</sup>	n	45	37	18	296
78 <sup>h</sup>	n	88	7	5	270

**Tab. 5.3.** Typ pučení u buněk odebraných z různých částí obřích kolonií (A) a z monokolonií (B) rostoucích na GM médiu 26 dní. PI - ploidie; A - axiálně pučící buňky; P - polárně pučící buňky; R - náhodně pučící buňky; N - celkový počet buněk.

Ukázalo se, že typ pučení uvnitř kvasinkové kolonie není uniformní. V obřích koloniích haploidních kmenů, které v tekuté exponenciální kultuře pučely téměř výhradně axiálně, jsem zjistila významný podíl buněk pučících polárně a náhodně, a to už 5. den vývoje kolonie (data neuvedena). Ve starších koloniích těchto buněk přibývalo, vyskytovaly se především v oblasti vyvýšeného středového valu. Obdobně v obřích koloniích diploidních kmenů, které v tekuté exponenciální kultuře pučely téměř výhradně polárně, jsem ve středu kolonie zjistila významný podíl buněk pučících náhodně (tab. 5.3A). U monokolonií všech testovaných haploidních kmenů došlo podobně jako u obřích kolonií k poklesu podílu axiálně pučících buněk (tab. 5.3B).

Kmeny s přerušeným genem *BUD2*, které pučí náhodně, jsem použila pro zjištění vlivu nepolarizovaného typu pučení na morfologii kolonií. Na obrázcích 5.2A a 5.2C je patrné, že většina kolonií s přerušeným genem *BUD2* je hladší oproti koloniím rodičovských kmenů. Nicméně tento efekt je jen málo výrazný. Morfologie kolonií „vrásčitého“ kmene ΣSGH<sup>h</sup> byla přerušením genu *BUD2* také mírně ovlivněna. Kolonie *bud2* kmenů byly kompaktnější a méně „vrásčité“ (obr. 5.3A, 5.3B).

Přerušení genu *BUD2* ovlivnilo rovněž adhezi haploidních buněk k povrchu agarového média a invazivní růst do média. Všechny náhodně pučící kmeny s přerušeným genem *BUD2* zarůstaly do agarového média. Podobně zarůstaly do média i rodičovské kmeny GRF18<sup>h</sup> a KT308<sup>h</sup>, které přirozeně pučí náhodně. Oproti tomu rodičovské axiálně pučící kmeny do média vůbec nezarůstaly (YPH499<sup>h</sup>, OL1<sup>h</sup>, OB85<sup>h</sup>, 15B-AT34<sup>h</sup>); velice slabě zarůstal pouze kmen 78<sup>h</sup>, ale až po prodloužené kultivaci (obr. 5.2B). Buňky vrůstající do média byly téměř kulaté a tvořily shluky. Zdá se tedy, že předpokladem invazivního růstu je tvorba krátkých řetězků buněk, které mohou vznikat pouze při polárním či náhodném pučení. Axiální typ pučení vrůstání do média neumožňuje. Totéž bylo popsáno v souvislosti s invazivním růstem haploidních kmenů odvozených od Σ1278b. Invazivní růst těchto kmenů je podmíněn přepnutím axiálního typu pučení na monopolární (Roberts a Fink, 1994).

### 5.1.5 VLIV HUSTOTY VÝSEVU NA MORFOLOGII MONOKOLONIÍ

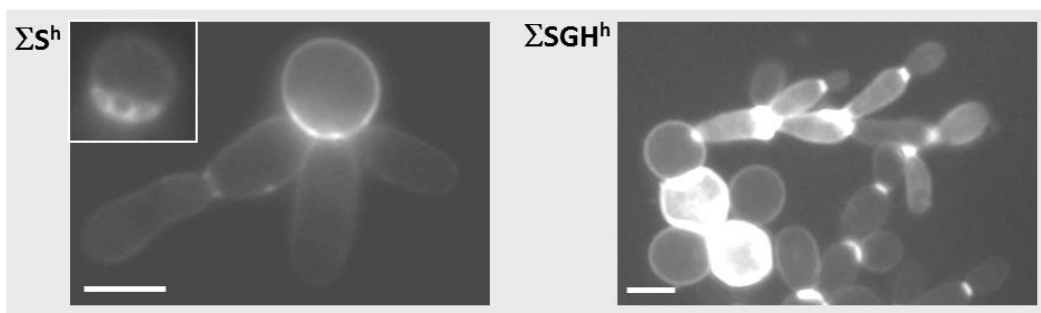
Vývoj obřích kolonií a tedy i jejich morfologie může být ovlivněna koncentrací buněk v inokulu během očkování. Proto jsem sledovala také morfologii monokolonií, které se vyvíjejí z jediné buňky.

Na jedné misce s GM médiem jsem kultivovala 1 nebo 30-60 nebo 100-140 monokolonií sedmi různých kmenů (YPH499<sup>h</sup>, OL1<sup>h</sup>, OB85<sup>h</sup>, 15B-AT34<sup>h</sup>, 78<sup>h</sup>, GRF18<sup>h</sup>, KT308<sup>h</sup>) po dobu 1 měsíce (obr. 5.2C). Monokolonie rostoucí osamoceně uprostřed kultivační misky byly u všech sedmi kmenů i po 30 dnech téměř hladké. Monokolonie všech sledovaných kmenů s výjimkou jediného byly při nejvyšší hustotě výsevu nejmenší a nejvíce strukturované. Výjimkou byl kmen YPH499<sup>h</sup>, který tvořil téměř hladké kolonie i při nejvyšší koncentraci buněk na misce. Rovněž „vrásčité“ monokolonie kmene  $\Sigma 1278^d$  a od něj odvozených kmenů  $\Sigma S^h$  a  $\Sigma SGH^h$  vytvořily svou typickou zvrásněnou morfologii mnohem dříve při hustším výsevu než při růstu jedné monokolonie ve středu kultivační misky.

Ukázalo se tedy, že morfologie monokolonií je výrazně ovlivněna hustotou výsevu monokolonií. Čím je hustota výsevu vyšší, tím jsou monokolonie menší a více strukturované.

### 5.1.6 VLIV AGREGACE BUNĚK NA MORFOLOGII KOLONIÍ

Zjistila jsem, že diploidní kmen  $\Sigma 1278^d$  a haploidní kmeny, od něho odvozené ( $\Sigma S^h$ ,  $\Sigma SGH^h$  a  $\Sigma SGHbud2^h$ ) tvořící výrazně strukturované „vrásčité“ kolonie (obří kolonie i monokolonie) se na GM médiu vyznačují tvorbou velkých buněčných agregátů, které jsou tvořeny buněčnými klastry. Buněčné klastry jsou shluky buněk, které vznikají nedokonalým oddělováním mateřských a dceřiných buněk při pučení. Agregáty (ani klastry) odebrané z kolonií se nerozpadaly v 0,25 M EDTA, což svědčí o tom, že podstatou shlukování v tomto případě není flokulace (vazba mezi povrchovými glykoproteiny a manózovými zbytky závislá na přítomnosti  $Ca^{2+}$  iontů; Stratford, 1988). Buňky tvořící agregáty se u testovaných kmenů nápadně lišily tvarem. Buňky  $\Sigma 1278^d$  byly ze všech nejdelší, výrazně protáhlé. Buňky kmenů  $\Sigma S^h$  a  $\Sigma SGH^h$  byly o něco kratší, buňky  $\Sigma SGHbud2^h$  byly téměř kulaté (obr. 5.3A,B). Typ pučení se u těchto kmenů rovněž výrazně lišil. Buňky tvořící klastry kmene  $\Sigma 1278^d$  pučely monopolárně. V klastrech haploidních  $\Sigma S^h$  a  $\Sigma SGH^h$  docházelo k přepnutí axiálního pučení na monopolární (obr. 5.3B), stejně jako v tekutém médiu (tab. 5.1). Změna axiálního pučení na monopolární byla provázena změnou tvaru buněk z kulatých či oválných na protáhlé (obr. 5.5). Buňky tvořící klastry u haploidního  $\Sigma SGHbud2^h$  pučely zcela náhodně.



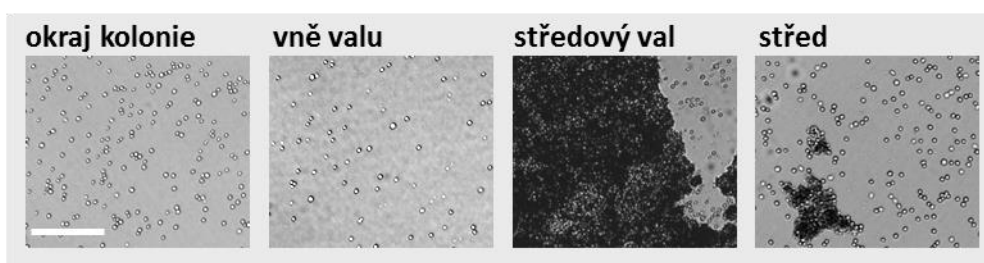
**Obr. 5.5.** Změna tvaru buněk po přepnutí na monopolární růst v obří kolonii  $\Sigma S^h$  (1 den kultivace na GM médiu) a v obří kolonii  $\Sigma SGH^h$  (1 měsíc kultivace na GM médiu). Vložená fotografie ukazuje jizvy po pučení na kulaté mateřské buňce. Měřítka 10  $\mu m$ .

Jinou morfologii měly kolonie diploidního kmene  $\Sigma\text{SG}^d$ , který vznikl křížením „vrásčitého“ kmene  $\Sigma\text{S}^h$  a málo strukturovaného kmene GRF18<sup>h</sup>. Jeho obří kolonie i monokolonie byly na GM médiu téměř hladké. Buňky v koloniích byly oválné a pučely převážně bipolárně. Tento kmen netvořil žádné klastry ani agregáty (obr. 5.3A,B).

Pokud jsem v živném GM médiu nahradila glycerol manózou (médiu G-man), všechny použité kmeny s genetickým pozadím  $\Sigma 1278b$  ( $\Sigma 1278^d$ ,  $\Sigma\text{S}^h$ ,  $\Sigma\text{SGH}^h$  a  $\Sigma\text{SGHbud2}^h$ ) vytvořily hladké kolonie (monokolonie i obří kolonie). V těchto koloniích bylo výrazně sníženo množství klastrů, agregáty se vůbec nevyskytovaly a buňky byly méně protáhlé (obr. 5.3C).

U ostatních testovaných laboratorních kmenů, s jiným genetickým pozadím než  $\Sigma 1278b$ , jsem buněčné agregáty našla u kmenů OL1<sup>h</sup>, OB85<sup>h</sup>, 15B-AT34<sup>h</sup> a 78<sup>h</sup> a rovněž u odpovídajících kmenů s přerušným genem *BUD2*. Agregáty se nacházely v oblasti středového valu, tedy v oblasti připomínající „vrásčitou“ morfologii (obr. 5.6). Tyto agregáty se rozpadaly v 0,25 M EDTA, což naznačuje, že vznikly flokulací.

Z uvedených výsledků vyplývá, že schopnost buněk tvořit klastry a agregáty je podmínkou pro tvorbu strukturované „vrásčité“ morfologie.



**Obr. 5.6.** Výskyt buněčných agregátů v různých částech obří kolonie haploidního kmene OL1<sup>h</sup> rostoucího 1 měsíc na GM médiu. Měřítka 100  $\mu\text{m}$ .

### 5.1.7 DISKUZE

Testování typu pučení exponenciálně rostoucích kultur v tekutém médiu odhalilo, že některé sbírkové haploidní kmeny pučí nestandardně. Nepučí uniformně axiálně, jak je pro haploidní kmeny typické (Hicks *et al.* 1977). Nestandardní typ pučení je patrně důsledkem nežádoucího hromadění mutací ve sbírkových kmenech. Známou mutací, která se vyskytuje ve vysokém procentu laboratorních kmenů je například mutace genu *FLO8*, která u těchto kmenů znemožňuje tvorbu pseudohyfy (Liu *et al.*, 1996).

Získané výsledky ukázaly vliv polarizovaného typu pučení na morfologii kolonií *Saccharomyces cerevisiae*. Přerušení genu *BUD2*, které vede k náhodnému pučení buněk, ovlivnilo morfologii většiny kolonií. Vliv nebyl příliš výrazný, ale kolonie byly hladší (obr. 5.2A,C a 5.3A). Stejný efekt se patrně projevuje u kmenů GRF18<sup>h</sup> a KT308<sup>h</sup>. Jejich buňky pučí náhodně a kolonie jsou relativně hladké (i bez přerušení genu *BUD2*). Oproti tomu v koloniích s výraznější morfologií jsem zjistila odlišný typ pučení v různých částech kolonie (tab. 5.3A). Je pravděpodobné, že přepínání na jiný typ pučení v určité oblasti kolonie je důsledkem nedostatku živin v této oblasti. Přepnutí typu pučení v důsledku hladovění popsali už dříve Madden a Snyder (1992), kteří u hladovějících haploidních kmenů v tekutém médiu pozorovali přepnutí z axiálního pučení na bipolární, poté co byly do média přidány živiny. Naopak bipolární pučení diploidních buněk v tekutém médiu není předcházejícím hladověním ovlivněno (Chant a Pringle, 1995).

Další pozorované jevy podporují předpoklad, že vznik strukturované morfologie souvisí nedostatkem živin. Jednak se morfologie kolonií mění s tím, jak kolonie stárne. Starší kolonie jsou více strukturované a obsahují větší podíl neaxiálně pučících buněk než mladší kolonie (u haploidních kmenů). Pokusy s monokoloniemi zase ukázaly, že morfologie kolonií je ovlivněna hustotou monokolonií na kultivační misce, která zase ovlivňuje rychlost vyčerpání živin z média. Čím je hustota kolonií vyšší (a koncentrace živin relativně nižší), tím dříve vzniká strukturovaná morfologie.

Zjistila jsem, že nejvýraznější vliv na morfologii kolonií má tvorba buněčných agregátů. „Vrásčité“ kolonie kmenů s genetickým pozadím  $\Sigma 1278b$  vždy tyto agregáty obsahují (obr. 5.3B). Pokud jsou kolonie hladké (např. při kultivaci stejných kmenů na médiu s manózou), buněčné agregáty v koloniích nejsou přítomny (obr. 5.3C). Agregáty jsou složeny z buněčných klastrů, pro které je typické monopolární pučení. U klastrů haploidních kmenů je patrné, jak buňky pučící axiálně přepnuly typ pučení na monopolární. Toto přepnutí je většinou provázeno prodloužením buněk a vede tak k efektivnějšímu zvětšování klastrů (obr. 5.5).

Buňky tvořící buněčné agregáty a patrně i klastry jsou pravděpodobně spojeny prostřednictvím extracelulární matrix (ECM). Důležitost ECM pro tvorbu „vrásčitých“ kolonií ukázalo studium kmene *S. cerevisiae* BR-F izolovaného z přírody (Kuthan *et al.*, 2003; Váchová *et al.*, 2011). Kmen BR-F produkuje velké množství ECM. Domestikace tohoto kmene v laboratorních podmínkách je spojena se ztrátou ECM a tvorbou hladkých kolonií.

Chování kmenů s genetickým pozadím  $\Sigma 1278b$  je ovlivněno přítomností povrchového glykoproteinu, proteinu Flo11p (Lo a Dranginis, 1998), který je nezbytný pro filamentární růst, invazivní růst, adhezi k plastovým povrchům a tvorbu biofilmu, tzv. „matů“ (Reynolds a Fink, 2001). V pozdějších publikacích byl prokázán vliv genu *FLO11* na tvorbu „vrásčitých“ kolonií (Šťovíček *et al.*, 2010; Vopálenská *et al.*, 2010). Protein Flo11p se patrně podílí na tvorbě klastrů a agregátů. Je známo, že transkripce genu *FLO11* klesá se vzrůstající ploidií buněk (Galitski *et al.*, 1999) a tomu odpovídá výraznější „vrásčitá“ morfologie u haploidních kmenů ( $\Sigma S^h$  a  $\Sigma SGH^h$ ) než u kmene diploidního ( $\Sigma 1278^d$ ; obr. 3A,B). Tvorba hladkých kolonií diploidního kmene  $\Sigma SG^d$  (obr. 3A,B), který vznikl křížením laboratorního kmene GRF18<sup>h</sup> s kmenem  $\Sigma S^h$ , zase může souviset s mutací genu *FLO8* v genomu kmene GRF18<sup>h</sup>. Transkripční faktor Flo8p je

totiž nezbytný pro expresi genu *FLO11*. Absence Flo8p u většiny laboratorních kmenů je jednou z příčin, proč většina laboratorních kmenů nemůže tvořit pseudohyfy (Liu *et al.*, 1996).

Na tvorbě buněčných agregátů a tedy i na tvorbě „vrásčité“ morfologie by se mohla částečně podílet i flokulace. Svědčí pro to skutečnost, že kolonie na médiu s manózou, která brání flokulaci buněk, jsou výrazně hladší a nevyskytují se v nich velké agregáty. Literární údaje týkající se flokulace závislé na flokulinu Flo11p nejsou jednotné. Zatímco Bayly *et al.* (2005) uvádějí, že je tato flokulace inhibována manózou a ne glukózou (flokulace typu Flo1) a je závislá na  $\text{Ca}^{2+}$  iontech (u kmenů odvozených od *S. cerevisiae* var. *diastaticus*), Guo *et al.* (2000) publikovali, že tvorba agregátů vznikajících při nadprodukci Flo11p není inhibována přítomností manózy a nevyžaduje přítomnost  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (u kmenů s genetickým pozadím  $\Sigma 1278b$ ). Také je možné, že přítomnost manózy v živném médiu inhibuje expresi *FLO11*, což vede k nižší intenzitě monopolárního pučení a snížení tvorby buněčných klastrů a agregátů.

Vliv tvorby buněčných agregátů na morfologii kolonií potvrzuje i studium laboratorních kmenů s jiným genetickým pozadím než  $\Sigma 1278b$ . Přestože tyto agregáty mají jiný charakter (rozpadají se působením 0,25 M EDTA) i zde platí, že se nevyskytují v hladkých koloniích nebo v hladkých částech strukturovaných kolonií. Typickou oblastí tvořenou buněčnými agregáty je oblast vyvýšeného středového valu (obr. 5.6). Za agregaci u těchto kmenů by mohl být zodpovědný flokulin Flo10p. Gen *FLO10* je epigeneticky regulovaný a aktivovaný spontánně vznikajícími mutacemi *IRA* genů (Halme *et al.*, 2004). Je možné, že v těchto oblastech kolonie, kde přibývá stárnoucích buněk, je umlčený *FLO10* aktivován a flokulin Flo10p se podílí na vzniku buněčných agregátů.

Z uvedených výsledků vyplývá, že při vzniku organizované struktury „vrásčitých“ kolonií kmenů odvozených od  $\Sigma 1278b$  hraje zásadní roli tvorba velkých buněčných agregátů, které jsou tvořeny buněčnými klastry. Předpokladem vzniku těchto agregátů je pravděpodobně monopolární typ pučení a přítomnost flokulinu Flo11p a ECM. U méně strukturovaných kolonií jiných kmenů se uplatňuje odlišný typ pučení v různých částech kolonií.

#### **Výsledky práce jsou prezentovány v následující publikaci: (Vopálenská *et al.*, 2005)**

Vopálenská I., Hůlková M., Janderová B., Palková Z. (2005): The morphology of *Saccharomyces cerevisiae* colonies is affected by cell adhesion and the budding pattern. Res Microbiol. 2005 Nov; 156(9):921-31. IF<sub>2005</sub>: 2,426

## 5.2 ROLE DVOU ODLIŠNÝCH DIMORFNÍCH PŘEMĚN PŘI VÝVOJI KOLONIÍ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

V druhé části své práce jsem se zaměřila na kmeny *Saccharomyces cerevisiae* s genetickým pozadím  $\Sigma 1278b$  ( $\Sigma 1278^d$ ,  $\Sigma S^h$ ), které na komplexním médiu s glycerolem jako zdrojem uhlíku (GM a GM-BKP médium) tvoří výrazně strukturované „vrásčité“ kolonie (obr. 5.3A,B). Snažila jsem se zjistit, jakým způsobem tyto struktury vznikají a co jejich vznik a výsledný tvar ovlivňuje. Zjišťovala jsem, jakou roli při tom hraje přepínání typu pučení z axiálního na monopolární (u haploidního kmene) a přepínání na pseudohyální růst (u diploidního kmene).

### 5.2.1 PŘEPNUTÍ NA MONOPOLÁRNÍ RŮST JE OVLIVNĚNO HUSTOTOU MONOKOLONIÍ

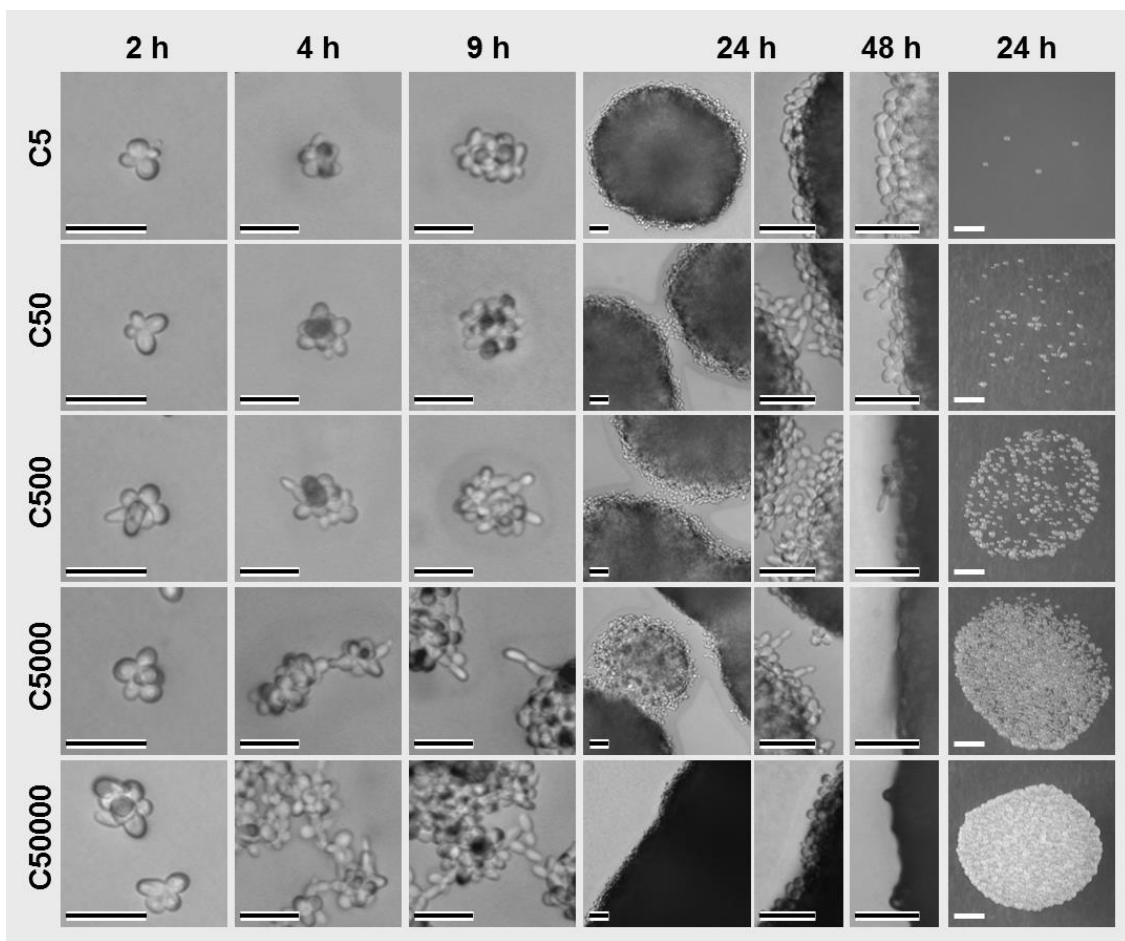
Abych získala představu o raném vývoji obřích kolonií a monokolonií, očkova jsem na GM médium kapku buněčné suspenze o objemu 5  $\mu$ l a různé koncentraci buněk (C5-C50000, tab. 5.4 a obr. 5.7). K očkování jsem použila kulturu haploidního kmene  $\Sigma S^h$  exponenciálně rostoucí v tekutém komplexním YEPG médiu, která byla tvořena většinou malými klastry axiálně pučících buněk (3-8 buněk). Malá část klastrů pučela monopolárně.

Zaočkované buňky se zpočátku vyvíjely jako monokolonie a teprve po určité době (v závislosti na koncentraci inokula) srostly a vytvořily obří kolonii. V monokoloniích zaočkovaných při použití inokula o nejnižší koncentraci (C5) pučely všechny buňky axiálně, tedy nezávisle na tom, zda byl původní klastř tvořen buňkami pučícími axiálně nebo monopolárně. Oválné buňky na okraji kolonií pučely axiálně minimálně 48 hodin (obr. 5.7-C5). Při vyšších koncentracích inokula (C50-C50000) došlo na okraji monokolonií k přepnutí axiálně pučících oválných buněk na monopolárně pučící protáhlé buňky, a to tehdy, když se rostoucí monokolonie přiblížily k sousedním monokoloniím. Čím vyšší byla výchozí koncentrace inokula, tím dříve došlo k tomuto přepnutí typu pučení. Při koncentraci C50000 a C5000 k němu došlo už po 4 hodinách růstu, při koncentraci C50 po 24 hodinách (tab. 5.4; obr. 5.7). Zejména u monokolonií, u kterých došlo k přepnutí na monopolární pučení až po 24 hodinách, byl nápadný orientovaný růst protáhlých monopolárních buněk směrem k sousední kolonii (obr. 5.7-C50 a obr. 5.8A). Přibližně 78 % monopolárně pučících buněk bylo orientováno směrem k sousední kolonii (při třech nezávislých experimentech bylo hodnoceno vždy minimálně 200 kolonií).

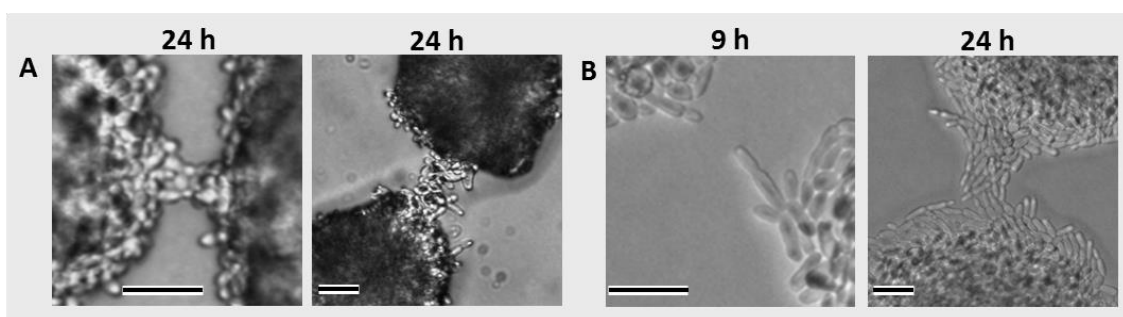
Hustota výsevu	Počet buněk v kapce (5 $\mu$ l)	Doba přepnutí na monopolární pučení (h)	Viditelná alkalizace média (h)	Počátek tvorby „vrásčité“ morfologie (h)
<b>C5</b>	1-5	48 (minimálně)	36-48*	72
<b>C50</b>	30-50	24	36-48*	55-72
<b>C500</b>	300-500	4-9	30**	50-60
<b>C5000</b>	3000-5000	4	20**	36
<b>C50000</b>	30000-50000	4	11**	24

**Tab. 5.4.** Vliv hustoty výsevu na vývoj kolonií. Čísla (v hodinách) uvádějí dobu kultivace na GM médiu, která předcházela: přepnutí na monopolární pučení, nástupu alkalické fáze a počátku tvorby „vrásčité“ morfologie. \*slabá alkalizace pod monokoloniemi; \*\*silná alkalizace pod monokoloniemi a také v jejich okolí.





**Obr. 5.7.** Vývoj monoklonií a přepínání typu pučení u kmene *S. cerevisiae*  $\Sigma S^h$  na GM médiu. Monokolonie byly vysety v různých koncentracích (C5-C50000). Po 24 a 48 hodinách kultivace byly vyfotografovány detaily okraje monoklonií. Černobílé měřítko 20  $\mu m$ . Po 24 hodinách byl vyfotografován také celkový pohled na zaočkované monokolonie, které při nejhustších výsevech (C50000 a C5000) již srůstaly a tvořily obří kolonie. Bílé měřítko 1 mm.



**Obr. 5.8.** Polarizovaný růst buněk na okraji monoklonií  $\Sigma S^h$  (A) a  $\Sigma 1278^d$  (B). Monopolárně pučící buňky směřují k sousední kolonii. GM médium; měřítko 20  $\mu m$ .

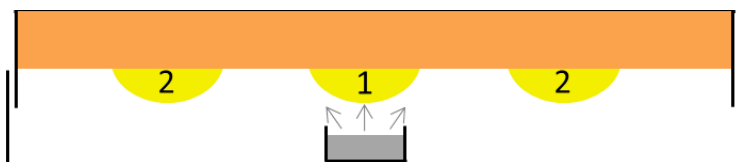
Popsané přepínání typu pučení a vývoj kolonií v průběhu 24 hodin kultivace nemohlo být ovlivněno nedostatkem živin, neboť živiny byly v kultivačním médiu v dostatečném množství. Zvýšení ani snížení vrstvy živného média ani změna koncentrace glycerolu v GM médiu (0,5 %, 1 % nebo 3 %) vývoj kolonií nijak neovlivnily.

### 5.2.2 PRVNÍ DIMORFNÍ PŘEMĚNA JE INDUKOVÁNA AMONIAKEM A VEDE K ORIENTOVANÉMU RŮSTU SOUSEDNÍCH MONOKOLONIÍ

Protože obří kolonie krátce po zaočkování na GM médium produkují malé množství amoniaku (Palková *et al.*, 1997; obr. 3.2) a protože amoniak působí jako signální molekula a vede k synchronizovanému vývoji monokolonií (Palková a Forstová, 2000), zjišťovala jsem, zda přepínání typu pučení z axiálního na monopolární nesouvisí rovněž s produkcí amoniaku. Kultivace jsem proto prováděla nejen na GM médiu, ale i na médiu s pH indikátorem, bromkresolovým purpurem (GM-BKP médium), který při pH vyšším než 6,8 změni barvu na fialovou.

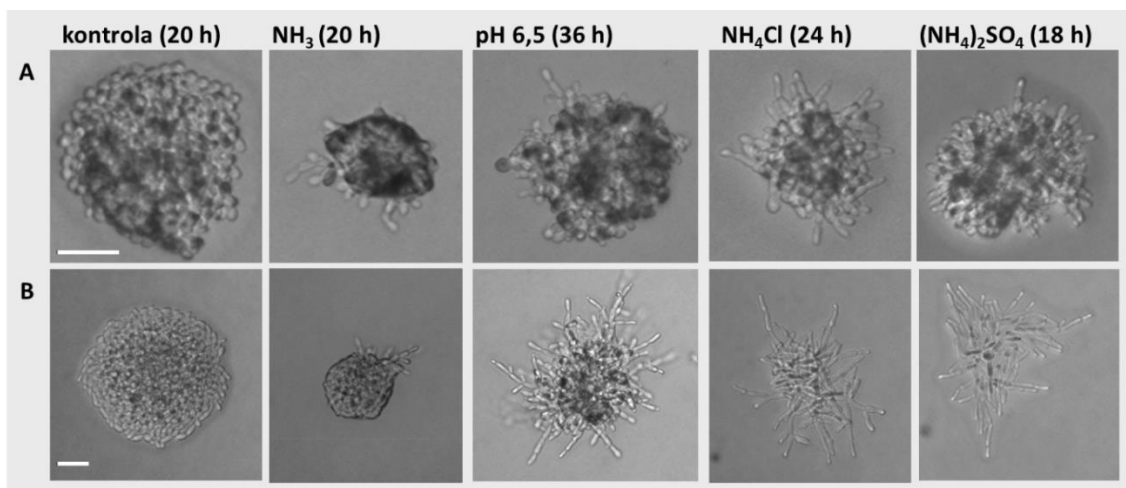
Ukázalo se, že během raného vývoje monokolonií dochází v jejich blízkosti k alkalizaci živného média. Rychlost nástupu alkalické fáze závisela na hustotě výsevu monokolonií (tab. 5.4.) Při hustých výsevech nastala silná alkalizace mezi monokoloniemi, které již dorostly do těsné blízkosti, po přibližně 11 hodinách (C50000), 20 hodinách (C5000) a 30 hodinách (C500). Při řidším výsevu byla alkalizace slabší; pozorovala jsem pouze slabě fialové zbarvení pod monokoloniemi po 36-48 hodinách.

Abych ověřila, že je alkalizace příčinou přepnutí na monopolární pučení a ne naopak důsledkem tohoto přepnutí, indukovala jsem monokolonie amoniakem z umělého zdroje (obr. 5.9).



**Obr. 5.9.** Indukce kvasinkových monokolonií amoniakem nebo plynnými aminy z umělého zdroje. Kvasinkové kolonie (na schématu žlutě) rostoucí na pevném GM médiu (oranžově) byly vystaveny silnějšímu (kolonie č. 1) a slabšímu (kolonie č. 2) působení amoniaku nebo aminů (šedě), které byly nanášeny do mističky umístěné ve víčku Petriho misky.

Monokolonie haploidního kmene  $\Sigma S^h$  osamoceně rostoucí na GM médiu (koncentrace C5) indukované amoniakem přepnuly typ pučení na monopolární. Po 18 hodinách růstu byly na okrajích kolonií nepochybně monopolárně pučící protáhlé buňky. Kontrolní neindukované kolonie měly hladké okraje a neobsahovaly protáhlé monopolárně pučící buňky. Při vyšších dávkách amoniaku (kolonie č. 1 na obr. 5.9) měly indukované kolonie menší průměr než kontrolní neindukované kolonie (obr. 5.10A.). Při nižších dávkách amoniaku (kolonie č. 2 na obr. 5.9) nebyl růst kolonií zpomalen, monopolární buňky se často vyskytovaly jen na té straně kolonie, která byla blíže zdroji amoniaku. Stejný efekt jako amoniak měly i plynné aminy (metylamin a propylamin). Ty také indukovaly přepnutí na monopolární pučení; v některých případech byl vývoj monopolárních buněk polarizovaný – buňky směřovaly ke zdroji aminů.



**Obr. 5.10.** Indukce přepnutí axiálního pučení na monopolární působením amoniaku, zvýšeného pH a vyšší koncentrace amonných iontů. Monokolonie kmene  $\Sigma S^h$  (A) a kmene  $\Sigma 1278^d$  (B) osamoceně rostoucí na GM médiu a indukované amoniakem, pH 6,5, 150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a 75 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  byly kultivovány 20, 36, 24, resp. 18 hodin. Kolonie neindukovaná (kontrola) rostla 20 hodin. Měřítka 20  $\mu\text{m}$ .

Abychom rozlišili, zda je příčinou přepínání amoniak nebo zvýšené pH vyvolané působením amoniaku, kultivovala jsem osamoceně rostoucí monokolonie  $\Sigma S^h$  na GM médiu s pH upraveným na hodnotu 6,5 a také na GM médiu se zvýšenou koncentrací amonných iontů (150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a 75 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Kolonie rostoucí při vyšším pH i kolonie rostoucí při zvýšené koncentraci amonných iontů přepnuly na monopolární pučení dříve než kolonie na standardním GM médiu. Při dostatku amonných iontů přepnuly nejdříve, po 24 nebo 18 hodinách. Při vyšším pH byl růst kolonií pomalejší a k přepnutí došlo až po 36 hodinách. Kontrolní kolonie na běžném GM médiu přepnuly na monopolární pučení nejdříve za 48 hodin (obr. 5.10A).

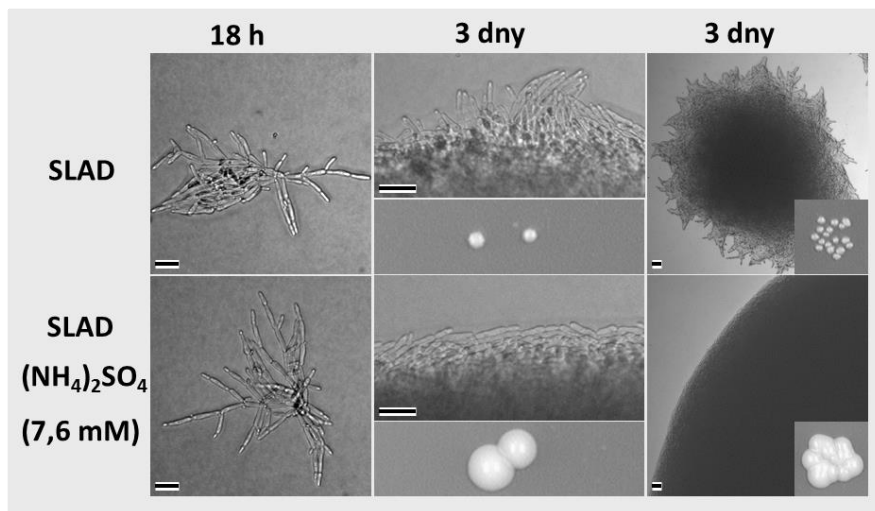
Orientovaný filamentární růst a vliv amoniaku, amonných iontů i pH na dimorfní přepnutí jsem pozorovala nejen u kmene  $\Sigma S^h$ , ale rovněž u kmene  $\Sigma 1278^d$  (obr. 5.10B). U diploidního kmene  $\Sigma 1278^d$  docházelo k přepnutí polárně pučících buněk na monopolárně pučící buňky tvořící dlouhá a větvená filamenta (pseudohyfy). Skutečnost, že filamenta haploidních kmenů s tímto genetickým pozadím bývají kratší, méně větvená a tvořená méně protáhlými buňkami, byla popsána již dříve (Roberts a Fink, 1994).

Získané výsledky o vlivu nadbytku amonných iontů na přepínání na filamentární růst u kmenů  $\Sigma S^h$  a  $\Sigma 1278^d$ , byly zdánlivě v rozporu s výsledky jiných autorů. Gimeno *et al.* (1992) popsali u diploidních kmenů s genetickým pozadím  $\Sigma 1278b$  přepínání na pseudohyfální růst na okrajích kolonií rostoucích na SLAD médiu s 2 % glukózou a s 0,05 mM koncentrací síranu amonného. Naopak na SLAD médiu se zvýšeným množstvím amonných iontů (7,6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) pozorovali hladké okraje kolonií bez pseudohyf.

Abychom vysvětlili tento rozpor, kultivovala jsem monokolonie  $\Sigma S^h$  a  $\Sigma 1278^d$  na standardním SLAD médiu (0,05 mM síran amonný) a na třech variantách SLAD média se zvýšenou koncentrací síranu amonného (7,6 mM, 37,9 mM a 75,7 mM). Po 18 hodinách jsem pozorovala monopolární pučení u obou kmenů na všech 4 médiích. Kmen  $\Sigma 1278^d$  tvořil dobře vyvinuté pseudohyfy (obr. 5.11-18h). Ukázalo se tedy, že i na glukózovém SLAD médiu v přítomnosti amonných iontů dochází v rané fázi vývoje kolonií k přepnutí na monopolární růst.

Zcela jiná situace ovšem nastala po 3 dnech kultivace. Monokolonie kmene  $\Sigma 1278^d$  rostoucí na SLAD médiu tvořily na okraji pseudohyfy, zatímco kolonie  $\Sigma 1278^d$  rostoucí na stejném médiu s přidavkem 7,6 mM síranu amonného měly okraje hladké a bez pseudohyf (obr. 5.11-3 dny).

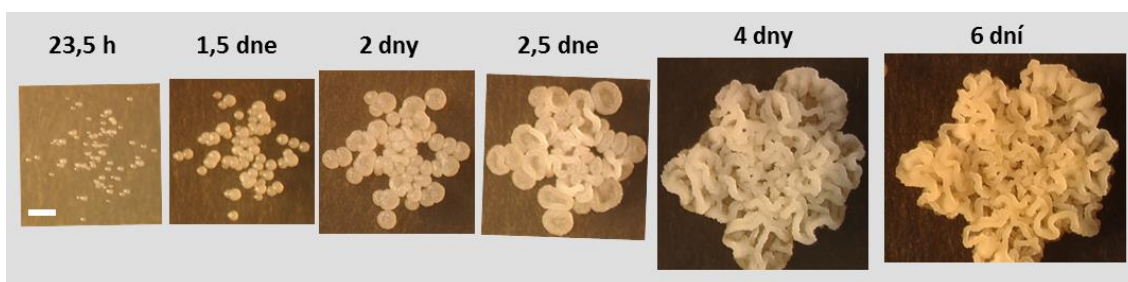
Právě situace po třech dnech kultivace odpovídá dříve publikovaným pozorováním (Gimeno *et al.*, 1992).



**Obr. 5.11.** Vývoj monoklonií  $\Sigma 1278^d$  na SLAD médiu a na SLAD médiu s přidavkem amonných iontů. Osamoceně rostoucí kolonie byly fotografovány po 18 hodinách a po 3 dnech kultivace. Kolonie rostoucí při hustším výsevu po 3 dnech. Měřítka 20  $\mu\text{m}$ .

### 5.2.3 DRUHÁ DIMORFNÍ PŘEMĚNA ČASOVĚ ODPOVÍDÁ ZAČÁTKU VÝVOJE „VRÁŠČITÉ“ MORFOLOGIE MONOKOLONIÍ A OBŘÍCH KOLONIÍ

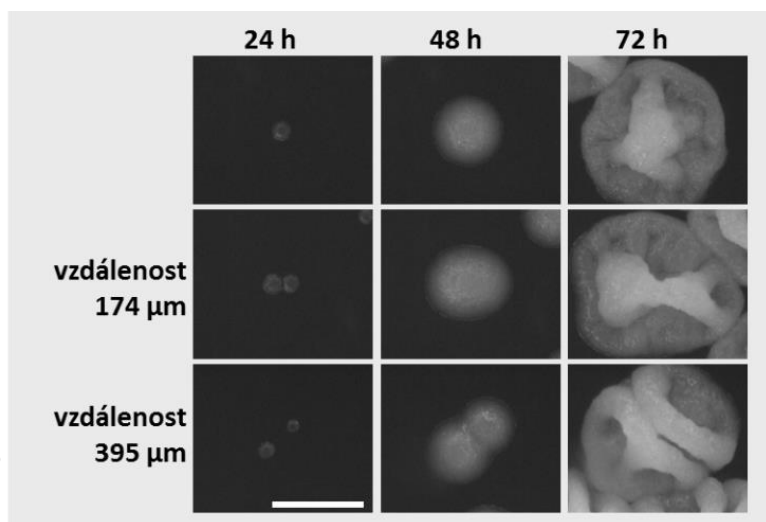
Při delší kultivaci obřích kolonií zaočkovaných buněčnou suspenzí kmene  $\Sigma S^h$  o různé koncentraci buněk (C5-C50000, tab. 5.4) jsem sledovala vývoj „vrásčité“ morfologie (obr. 5.12). Jednotlivé monokolonie byly nejdříve hladké, potom se jejich povrch začal strukturovat. Začátek tvorby „vrásčité“ morfologie byl závislý na výchozí koncentraci inokula. Hustěji zaočkované kolonie vytvořily „vrásčitou“ morfologii dříve (tab. 5.4).



**Obr. 5.12.** Vývoj „vrásčité“ morfologie kmene  $\Sigma S^h$  na GM médiu během 6 dnů. Měřítka 1 mm.

Přestože „vrásčitá“ struktura působí neuspořádaně, pozorovala jsem určité zákonitosti, které se uplatňují při jejím vývoji. V případě osamoceně rostoucích monoklonií vznikl nejdříve vyvýšený prstencový val na obvodu monokolonie a někdy zároveň s ním také středová vyvýšenina. U monoklonií rostoucích v blízkosti dalších monoklonií, závisel jejich vývoj na vzdálenosti mezi nimi. Pokud dvě monokolonie vyrostly ze dvou buněk zaočkovaných méně

než 0,2 mm od sebe, během prvních 24 hodin kultivace srostly a dále se vyvíjely jako jedna kolonie, tj. vytvořily jeden prstencový val na obvodu. Pokud monokolonie srostly o několik hodin později (buňky byly zaočkovány minimálně 0,3 mm od sebe), vyvíjely se dále jako dvě kolonie a každá vytvořila svůj vlastní obvodový val (obr. 5.13). V dalších dnech se obvodové valy i středové vyvýšené části zvětšovaly, vlnily, spojovaly či štěpily. Překvapivé bylo, že nevznikaly žádné nové struktury na obvodu kolonie (minimálně do 6. dne kultivace).

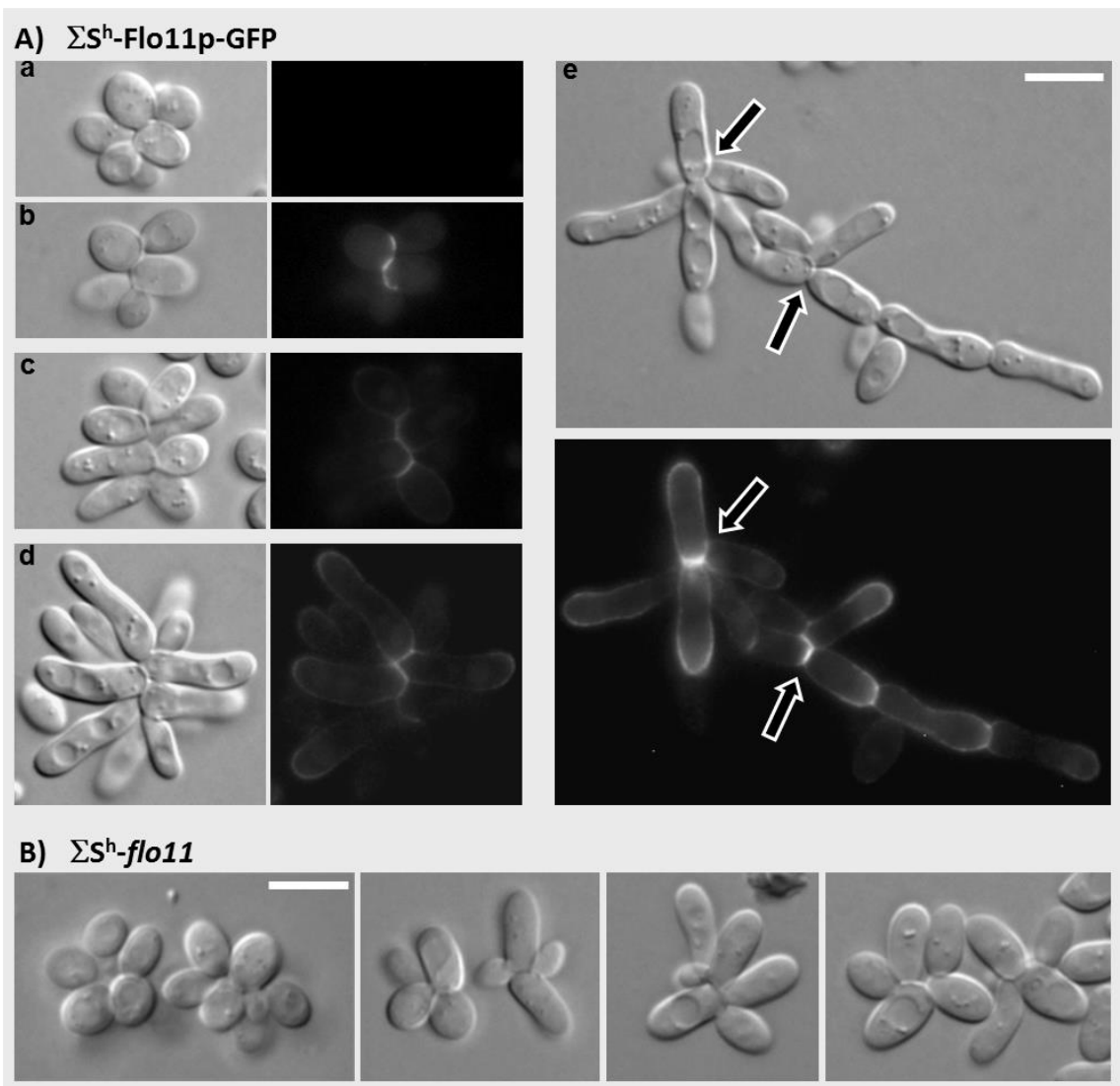


**Obr. 5.13.** Začátek tvorby „vrásčité“ morfologie u monoklonií  $\Sigma S^h$  na GM médiu. Osamoceně rostoucí kolonie vytvořila obvodový val a vyvýšenou středovou část. Monokolonie vyrostlé z buněk vzdálených 174  $\mu m$  se chovaly jako jedna kolonie. Monokolonie vyrostlé z buněk vzdálených 395  $\mu m$  se chovaly jako dvě nezávislé kolonie, každá vytvořila svůj vlastní obvodový val. Měřítka 1 mm.

S tvorbou „vrásčité“ morfologie je spojena druhá dimorfní přeměna, kterou podstupuje část buněk uvnitř kolonie. Uvnitř mladých monoklonií  $\Sigma S^h$ , které jsou prozatím hladké, jsem pozorovala axiální klastry tvořené kulatými nebo protáhlými buňkami (viz snímky pořízené při viditelném světle na obr. 5.14A-a,b,c). Tyto buňky se během vývoje kolonií postupně prodlužovaly (viz snímek pořízený při viditelném světle na obr. 5.14A-d) a v době těsně před vznikem „vrásčitých“ struktur začaly pučet monopolárně a tvořit pseudohyfy (viz snímek pořízený při viditelném světle na obr. 5.14A-e). Přepnutí na monopolární pučení jsem pozorovala jen u části klastrů přítomných v kolonii; tyto klastry se vyskytovaly uvnitř kvasinkové kolonie rozptýleně v celém jejím objemu.

#### 5.2.4 ÚLOHA FLOKULINU FLO11 PŘI DRUHÉ DIMORFNÍ PŘEMĚNĚ A PŘI VÝVOJI „VRÁŠČITÉ“ MORFOLOGIE

Protože jsme předpokládali podíl flokulinu Flo11p na vývoji kolonií kmene  $\Sigma S^h$ , kolega Vratislav Šťovíček připravil kmen s genem *FLO11* označeným proteinem GFP ( $\Sigma S^h$ -Flo11p-GFP) a kmen s delecí genu *FLO11* ( $\Sigma S^h$ -*flo11*). Kmen  $\Sigma S^h$ -Flo11p-GFP má gen GFP vložený přímo v genomu za signální sekvencí genu *FLO11*. Vývoj a morfologie kolonií označeného kmene a kmene  $\Sigma S^h$  jsou totožné.

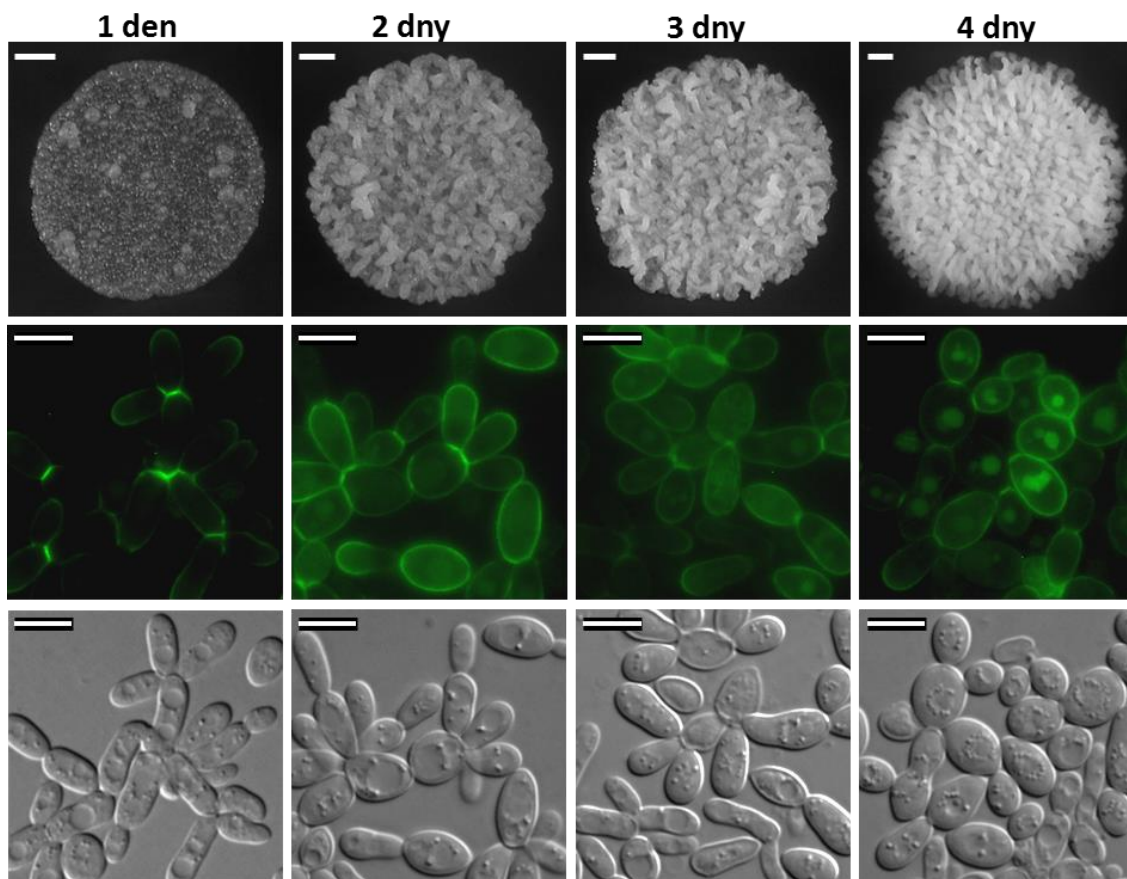


**Obr. 5.14.** A) Přehled typů klastrů pozorovaných u monoclonií kmene  $\Sigma S^h$ -Flo11p-GFP na GM médiu. a) Axiální klastry neprodukující fúzní protein Flo11p-GFP (viz kapitola 5.2.4). b,c) Axiální klastry tvořené zakulacenými, resp. protáhlými buňkami s proteinem Flo11p-GFP lokalizovaným v místě vzniku pupenů. d) Axiální klastry tvořené výrazně protáhlými buňkami s Flo11p-GFP signálem v místě vzniku pupenů a nově také na distálním konci buněk. e) Dva axiální klastry (označené šipkami), které v rámci druhého dimorfního přepnutí začaly pučet monopolárně a tvořit pseudohyfy s výraznou lokalizací Flo11p-GFP na distálním konci buněk. (Buňky zobrazené pomocí Nomarského kontrastu a fluorescence GFP; měřítko 5  $\mu$ m). B) Axiální klastry kmene  $\Sigma S^h$ -*flo11* na GM médiu tvořené oválnými nebo mírně protáhlými buňkami (C50-C500; 48 hodin kultivace). (Buňky zobrazené pomocí Nomarského kontrastu; měřítko 5  $\mu$ m).

První viditelná produkce fúzního proteinu Flo11p-GFP v mladých monocloniích byla závislá na hustotě výsevu. U hustě zaočkovaných monoclonií (C50000) nastala po 9 hodinách růstu, u osamoceně rostoucích kolonií (C5) až po 36 hodinách. Prvotní fluorescence byla vždy lokalizována do oblasti krčku pupenů kulatých či oválných buněk tvořících klastry (obr. 5.14A-b,c). Lokalizaci Flo11p-GFP v místě spojení mateřských a dceřiných buněk jsem potvrdila barvením stejných preparátů fluorescenčním barvivem calcofluorem, které barví jizvy po pučení. Oba fluorescenční signály byly lokalizovány ve stejném místě s tím rozdílem, že signál Flo11p-GFP neměl tvar prstence, což je typický tvar pozorovaný při barvení jizev calcofluorem. Během dalšího prodlužování buněk se protein Flo11p-GFP začal objevovat i na distálním konci



buněk (obr. 5.14A-d). Přibližně 1 den po první viditelné produkci proteinu Flo11p-GFP došlo k druhému dimorfnímu přepnutí na pseudohyální růst a k začátku vytváření „vrásčité“ morfologie. V této době signál Flo11p-GFP na distálním konci buněk zesílil a postupně se rozšířil po celém povrchu protáhlých buněk (obr. 5.14A-e; obr. 5.15- 1 a 2 dny).



**Obr. 5.15.** Lokalizace flokulinu Flo11p-GFP v buňkách starších kolonií kmene  $\Sigma^h$ -Flo11p-GFP (C50000) kultivovaných 1 - 4 dny na GM médiu. Lokalizace Flo11p-GFP v místě vzniku pupenu a v distální části buněk je typická pro období začínající tvorby „vrásčité“ morfologie (1 den). V době intenzivní tvorby „vrásčité“ morfologie je Flo11p-GFP přítomen na celém povrchu buněk (2 dny), poté jeho hladina klesá (3 dny) a nakonec se GFP signál objevuje ve vakuolách (4 dny). Kolonie, měřítko 1 mm; buňky, měřítko 5  $\mu$ m. (Snímky pořídil Vratislav Šťovíček).

U starších kolonií s vyvinutou „vrásčitou“ morfologií (3-4 dny kultivace při hustotě výsevu C50000) fluorescence Flo11p-GFP na povrchu buněk slábla a GFP signál se začal objevovat ve vakuolách, což byl pravděpodobně důsledek odstraňování Flo11p-GFP pomocí endocytózy (obr. 5.15- 3 a 4 dny).

Další experimenty prováděl Vratislav Šťovíček s kmenem neexprimujícím gen *FLO11* ( $\Sigma^h$ -*flo11*). Zjistil, že první dimorfní přeměna na monopolární pučení i směrovaný růst mezi blízkými monokoloniemi probíhá i bez flokulinu Flo11p. Naopak tvorba „vrásčité“ morfologie je na Flo11p závislá, protože kmen  $\Sigma^h$ -*flo11* tvořil pouze hladké kolonie. Oválné a mírně protáhlé buňky v hladkých koloniích nebyly nikdy tak protáhlé jako u rodičovského kmene  $\Sigma^h$ . Klastry  $\Sigma^h$ -*flo11* byly tvořeny menším počtem buněk. Ukázalo se rovněž, že Flo11p je nezbytný pro zarůstání kolonií do agarů. Kolonie  $\Sigma^h$  začaly zarůstat do agarů v době první dimorfní přeměny (po 9 hodinách růstu při hustém výsevu) a toto zarůstání zesílilo během druhé dimorfní

přeměny v době počínající tvorby „vrásčité“ morfologie. Oproti tomu kolonie  $\Sigma S^h\text{-}flo11$  do živného média téměř nezarůstaly.

## 5.2.5 DISKUZE

---

Zjistili jsme, že během vývoje strukturovaných kolonií odvozených od *S. cerevisiae*  $\Sigma 1278b$  dochází ke dvěma rozdílně regulovaným dimorfním přeměnám kvasinkových buněk. První nastává krátce po zaočkování monokolonií a přispívá k efektivní kolonizaci plochy živného média. Druhá dimorfní přeměna souvisí s pozdější tvorbou „vrásčité“ morfologie.

Raný vývoj monokolonií  $\Sigma S^h$  nebo  $\Sigma 1278^d$  se výrazně liší, pokud rostou osamoceně a pokud rostou v blízkosti dalších monokolonií. Rostou-li monokolonie osamoceně, na jejich okrajích nejsou žádné monopolárně pučící buňky; okraje kolonií jsou proto hladké (obr. 5.7 C5). Oproti tomu při hustším výsevu buňky na okraji kolonií přepínají na monopolární typ pučení a tvoří protáhlé buňky nebo pseudohyfy, které rostou směrovaně k blízké sousední kolonii (obr. 5.7 C50-C50000 a obr. 5.8). K této dimorfní změně dochází u haploidního i diploidního kmene, není tedy závislá na ploidii. Její rychlost a intenzita závisí na hustotě populace a je pravděpodobně důsledkem mezibuněčné komunikace. Přepnutí buněk na monopolární pučení a pseudohyfální růst nebylo při mých pokusech vyvoláno dusíkovým hladověním. Liší se tedy od přepínání na pseudohyfální růst, které bylo popsáno u buněk starších kolonií diploidního kmene  $\Sigma 1278b$  rostoucích na SLAD médiu za podmínek hladovění na dusík (Gimeno *et al.*, 1992; obr. 5.11- 3 dny). A liší se rovněž od přepnutí, ke kterému dochází při vysoké buněčné denzitě a je kontrolováno aromatickými alkoholy (tryptofol a fenyletanol) a které také probíhá za nedostatku dusíku (Chen a Fink, 2006). Námi pozorované přepínání na monopolární růst bylo indukováno působením amoniaku a plyných aminů, zvýšenou koncentrací amonných iontů v živném médiu a rovněž zvýšením pH živného media. Zdá se tedy, že amoniak funguje jako signální molekula, která indukuje orientovaný monopolární růst v mladých monokoloniích. Tuto hypotézu potvrzuje dřívější zjištění, že obří kolonie krátce po zaočkování produkují amoniak (Palková *et al.*, 1997). Je možné, že amoniak ovlivňuje chování buněk prostřednictvím změny pH v intracelulárním prostředí (např. ve vakuolách; (Palková a Váchová, 2003). Obdobným způsobem amoniak pravděpodobně ovlivňuje sociální chování améb hlenky *Dictyostelium discoideum*, kde slouží jako signální molekula v několika krocích tvorby mnohobuněčné struktury (Davies *et al.*, 1993).

Při silné indukci amoniakem (při hustém výsevu monokolonií nebo při silné indukci z umělého zdroje) jsou monokolonie ovlivněny ze všech stran, a proto monopolárně pučící buňky a pseudohyfy vznikají kolem celé kolonie. Pokud jsou kolonie vysety řídce, kolem jednotlivých monokolonií pravděpodobně vzniká gradient amoniaku, který může být detekován sousední monokolonií a vést k orientovanému monopolárnímu růstu jejích buněk směrem ke zdroji amoniaku (obr. 5.8). Podobně se chovají haploidní kvasinkové buňky při křížení. Buňky vnímají gradient feromonu produkovaného buňkou opačného párovacího typu a díky tomuto gradientu vytvářejí výběžky (*shmoo*), které jsou orientované k buňce, se kterou se mohou zkrřížit (Jackson a Hartwell, 1990).

Zjištění, že mladé monokolonie rozpoznají ve svém okolí sousední monokolonie a směřují svůj růst směrem k nim, je zdánlivě v rozporu s dřívějšími poznatky získanými v naší laboratoři. Při studiu vlivu amoniaku na růst obřích kolonií se totiž ukázalo, že amoniak produkovaný staršími koloniemi při nedostatku živin přispívá k růstu kolonií směrem od sebe, tj. do oblastí, kde je živin relativně více (Palková *et al.*, 1997). Rozdíl je v tom, že mladé monokolonie rostoucí směrem k sobě rostou velmi krátce na čerstvém živném médiu s dostatkem živin a jejich chování tedy s nedostatkem živin nesouvisí.



Důsledkem prvního dimorfního přepnutí je tedy urychlení srůstání sousedních monoklonií a rychlé zabrání velké plochy živného média. Podobné chování bylo popsáno u bakterií *Escherichia coli* K-12. Bakteriální buňky zaočkované na živném médiu v těsné blízkosti také preferovaly růst směrem k sobě. Po sloučení blízkých monoklonií vznikla kolonie, jejíž vývoj byl synchronizován; téměř všechny buňky byly orientovány stejným směrem (Shapiro a Hsu, 1989). Předpokládá se, že mikroorganizmy v přírodním prostředí obecně preferují tvorbu organizovaných mnohobuněčných struktur (klonií a biofilmů), jejichž vývoj je synchronizován a které zvyšují šanci buněk přežít (Wimpenny, 2009).

Role amoniaku při indukci orientovaného růstu by mohla pro kvasinky znamenat výhodu při vyhledávání zdroje živin v přírodě. Zralé nebo poškozené ovoce totiž produkuje amoniak (Gatto *et al.*, 2008; Kato *et al.*, 2000), který může na kvasinkové buňky působit jako atraktant.

V další fázi vývoje rostou kolonie především do výšky a vytvářejí „vrásčitou“ morfologii. Tvorba této výrazně strukturované morfologie je podmíněna druhou dimorfní přeměnou, opět přepnutím typu pučení na monopolární, ale tentokrát v celém objemu kolonie. Vývoj monoklonií, které srostou dříve, než započne tvorba „vrásčité“ morfologie, je podobný jako vývoj osamocených monoklonií. Vyvíjejí se jako jeden celek, vytvářejí společný obvodový val. Oproti tomu monoklonie, které srostou později, se dále vyvíjejí jako samostatné jednotky, z nichž každá vytváří svůj vlastní obvodový val (obr. 5.13).

Při obou výše popsaných dimorfních přeměnách dochází k přepnutí na monopolární růst. První dimorfní přeměna, ke které dochází na okrajích kolonií, není závislá na přítomnosti flokulinu Flo11p. Oproti tomu druhá dimorfní přeměna, kterou podstupuje část buněk v celé kolonii, na proteinu Flo11p závislá je. Proto sousední monoklonie mutantního kmene  $\Sigma^h$ -*flo11*, které nemohou produkovat Flo11p, mohou v rané fázi vývoje efektivně srůstat díky monopolárně pučícím buňkám na okraji kolonií. V pozdější fázi už ale nedochází k prodlužování buněk a k přepínání na monopolární růst uvnitř kolonií a nedochází ke vzniku „vrásčité“ morfologie; kolonie zůstávají hladké (obr. 5.14B).

Flo11p je tedy patrně nezbytný pro prodlužování buněk a pro přepínání na „vrásčitou“ morfologii. Flo11p se v období iniciace tvorby „vrásčité“ morfologie vyskytuje nejprve v místě vzniku pupenu a později také na distálním konci buněk (obr. 5.15-1 den). Protože je jeho lokalizace výrazně polarizovaná, je možné, že se podílí na iniciaci a regulaci orientovaného růstu z axiálních klastrů a na uspořádání buněk v trojrozměrných strukturách „vrásčité“ kolonie. Později, kdy už je „vrásčité“ morfologie plně vyvinutá, je Flo11p lokalizovaný na celém povrchu buněk (obr. 5.15-2 dny). V této fázi by se flokulin Flo11p mohl uplatňovat při vzájemné adhezi buněk uvnitř výrazných trojrozměrných struktur a přispívat k jejich stabilitě. Důležitá role Flo11p při adhezi buněk tvořících velké agregáty a při adhezi buněk k různým povrchům byla prokázána již dříve (Reynolds a Fink, 2001; Reynolds *et al.*, 2008).

#### **Výsledky práce jsou prezentovány v následující publikaci: (Vopálenská *et al.*, 2010)**

Vopálenská I., Šťovíček V., Janderová B., Váchová L., Palková Z. (2010): Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture. *Environ Microbiol.* 2010 Jan; 12(1):264-77. IF<sup>2010</sup>: 5,537

### 5.3 VLIV METYLAMINU NA VÝVOJ KOLONIÍ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

---

Za standardních podmínek vývoje obřích kolonií *S. cerevisiae* na komplexním GM médiu s glycerolem dochází po krátkém přibližně 24hodinovém počátečním alkalickém pulzu k acidifikaci okolního média. Kyselá fáze trvá většinou 9 - 12 dní a po ní následuje druhá alkalická fáze, která je spojena s produkcí amoniaku (Palková *et al.*, 1997; obr. 3.2). Kolegyně Dita Strachotová ověřila, že je možné pomocí amoniaku a různých aminů (metylamin, propylamin) předčasně indukovat alkalizaci kolonií *S. cerevisiae* BY4742. Jako nejvhodnější induktor se ukázal metylamin (Strachotová, 2012). Důvodem, proč byl účinnější než amoniak, by mohla být jeho lepší průchodnost membránami. Molekula metylaminu je totiž více hydrofobní než molekula amoniaku (Ritchie a Gibson, 1987).

Cílem této části mé dizertační práce bylo najít vhodné podmínky pro účinnou indukci předčasné alkalické fáze u obřích kolonií *S. cerevisiae* pomocí metylaminu a zjistit, jaké změny alkalizace vyvolá. Jak ovlivní morfologii kolonií a diferenciaci uvnitř kolonií a jak se změní exprese genu *ATO1*-GFP. Domnělá permeáza amonných iontů Ato1p je významným markerem 2. alkalické fáze vývoje kolonií, protože na počátku této fáze dochází k výraznému nárůstu exprese genu *ATO1* (Palková *et al.*, 2002; Řičicová *et al.*, 2007). Při experimentech jsem použila kmen *S. cerevisiae* BY4742 a od něj odvozený kmen BY-Ato1p-GFP s proteinem Ato1p označeným pomocí GFP.

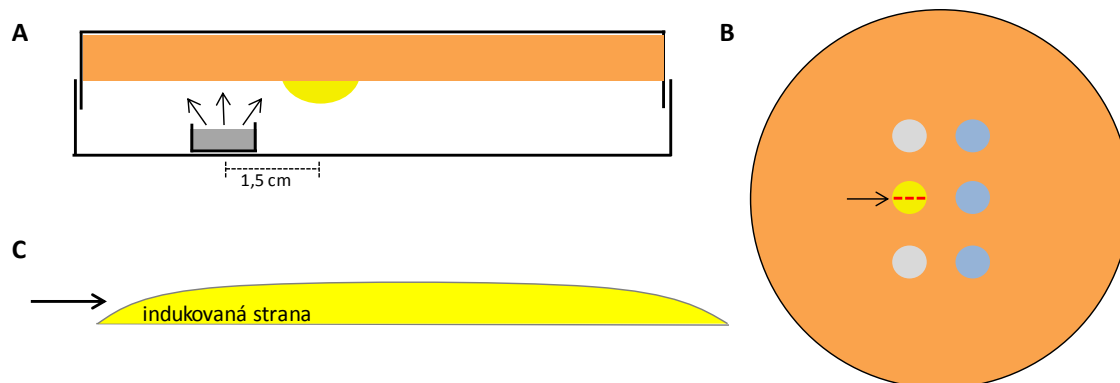
#### 5.3.1 METYLAMIN VYVOLÁVÁ PŘEDČASNOU ALKALICKOU FÁZI

---

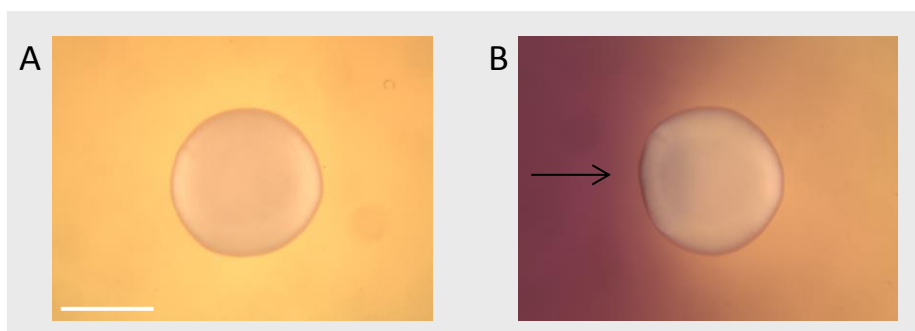
Hledala jsem nejvhodnější způsob, jak indukovat alkalizaci u kvasinkových kolonií v kyselé fázi vývoje. Kolonie jsem očkovala buď jednotlivě anebo více kolonií (3 nebo 6) na jednu misku. Kolonie jsem indukovala 300 mM roztokem metylaminu (100  $\mu$ l), který jsem nanesla do malé mističky umístěné ve víčku Petriho misky. Zkoušela různé vzdálenosti zdroje metylaminu od kolonie a také odlišné doby působení metylaminu (5 minut až 30 minut). Jako nejvhodnější se ukázala indukce 30 min ze zdroje vzdáleného 1,5 cm od kolonie (obr. 5.16A, obr. 5.17). Při tomto uspořádání byl účinek metylaminu na buňky nejvýraznější, došlo k silné alkalizaci a přitom nedošlo k poškození buněk.

Při následujících experimentech jsem kolonie indukovala v různých dnech během kyselé fáze (nejdříve 3. den kultivace, nejpozději 9. den kultivace) a různý počet dní. Obvykle jsem používala komplexní GM-BKP médium, které umožňuje sledovat změny pH média (fialové zbarvení při pH>6,8, žluté zbarvení při pH<5,2). Bromkresolový purpur v médiu mi rovněž umožnil (s pomocí fluorescenčního mikroskopu) sledovat, zda během indukce nedošlo k poškození buněk. BKP je fluorescenční barvivo, které intenzivně barví poškozené a mrtvé buňky.

Diferenciaci uvnitř kolonií jsem sledovala na tenkých (20  $\mu$ m a 50  $\mu$ m) vertikálních řezech kolonií. Vertikální řezy jsem vedla středem kolonie a rovnoběžně se směrem působení metylaminu (obr. 5.16B; viz kapitola 4.2.15). Část kolonie, která byla nejbližší zdroji metylaminu, je na všech obrázcích indukovaných řezů vlevo, oblast kolonie metylaminem nejméně ovlivněná je vždy vpravo.



**Obr. 5.16.** Schéma experimentálního uspořádání pro testování indukce alkalizace metylaminem. A) Metylamin je umístěn v malé mističce ve víčku Petriho misky ve vzdálenosti 1,5 cm od indukované kolonie (žlutě). B) Řez indukovanou kolonií (žlutá kolonie) je veden rovnoběžně se směrem působení metylaminu (červená přerušovaná čára). Lokalizace dalších kolonií v případě kultivace 3 kolonií je vyznačena světle šedou barvou. Lokalizace dalších kolonií v případě kultivace 6 kolonií je vyznačena tmavší modrou barvou. C) Řez indukovanou kolonií. Černé šipky - směr působení metylaminu.



**Obr. 5.17.** Indukce alkalizace u obřích kolonií kmene *S. cerevisiae* BY-Ato1p-GFP na GM-BKP médiu. A) Neindukovaná kolonie v kyselé fázi vývoje. B) Kolonie indukovaná 5. a 6. den 30 minut. Levá část kolonie je vystavena vyššímu pH než pravá část. Fotografováno 6. den kultivace. Černá šipka - směr působení metylaminu. Měřítka 5 mm.

### 5.3.2 PŮSOBENÍ METYLAMINU OVLIVŇUJE MORFOLOGII KVASINKOVÉ KOLONIE

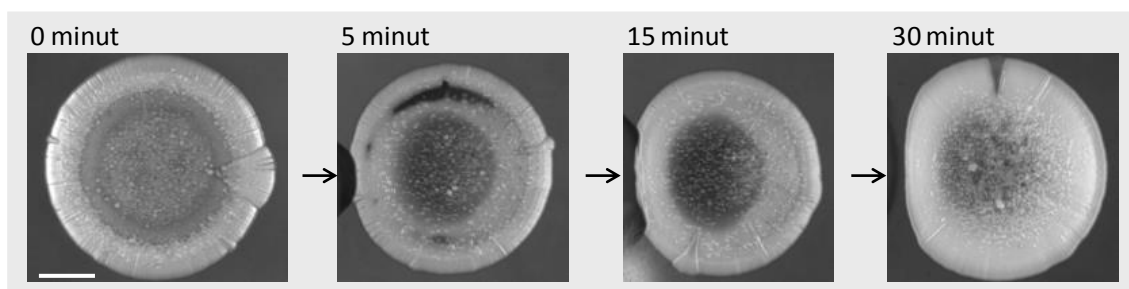
Abych posoudila vliv metylaminu na morfologii kvasinkových kolonií, porovnávala jsem účinek různě silných dávek metylaminu (kromě 30minutových indukcí také kratší indukce).

Obří kolonie kmene BY4742 rostoucí jednotlivě ve středu Petriho misky na GM-BKP médiu jsem 5 dní (4., 5., 6., 8. a 9. den kultivace) indukovala metylaminem. Pulz metylaminu jsem aplikovala vždy 1krát denně po dobu 5, 15 nebo 30 minut. Tato indukce probíhala v kyselé fázi vývoje kolonií; přirozený přechod do alkalické fáze u kolonií metylaminem neindukovaných nastal až 20. den. Po skončení kultivace (34. den) jsem porovnávala morfologii neindukovaných kolonií a kolonií indukovaných 5, 15 nebo 30 minut (obr. 5.18). Na neindukované kolonii (obr. 5.18-„0 minut“ a obr. 5.19A) je dobře patrná prstencová prohlubeň mezi středovou a okrajovou částí; tato prohlubeň je téměř bez papil. Čím delší byla doba působení metylaminu, tím méně zřetelná je prstencová prohlubeň a tím více je v této oblasti papil. U nejsilněji indukované kolonie (obr. 5.18-„30 minut“ a obr. 5.19B) prstencová prohlubeň vůbec není, kolonie má vypouklý profil, který je ovšem doplněný úzkým okrajovým lemem, kde biomasa

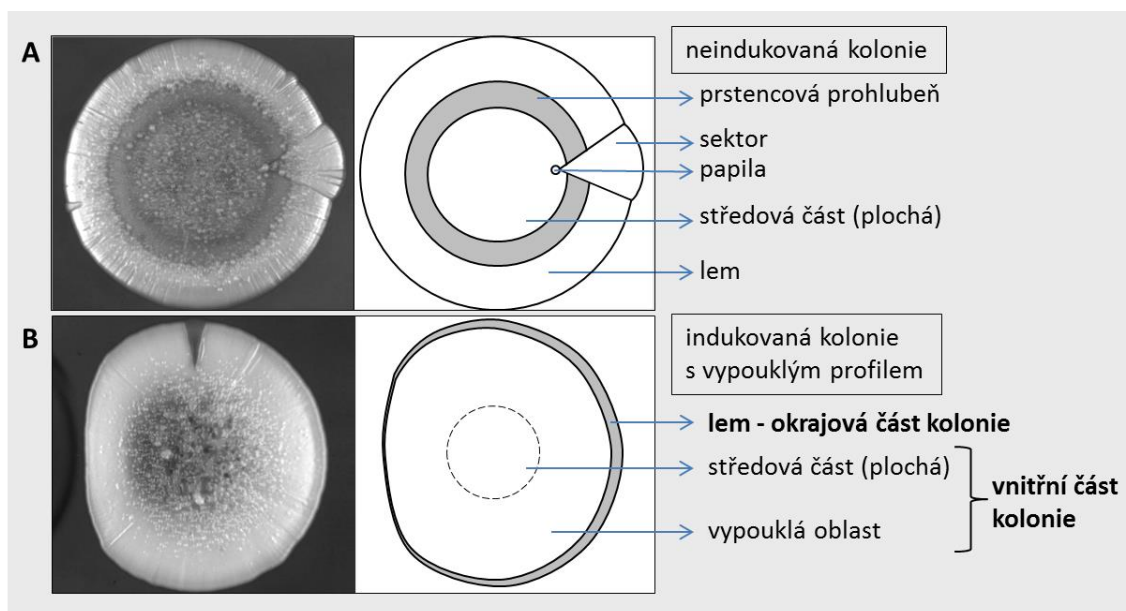
tvorí nápadně nižší vrstvu. Ve středové oblasti kolonie je profil kolonie mírně zploštělý, což je u starších kolonií obvyklé, protože růst v této oblasti je zpomalený nebo zastavený kvůli omezenému přísunu živin.

Pro účely této práce jsem zavedla označení pro jednotlivé části silně indukovaných kolonií: 1) okrajová část kolonie (úzký okrajový lem), 2) vnitřní část kolonie (celá kolonie s výjimkou okrajové části), 3) středová část (součást vnitřní části kolonie; přibližně odpovídá poloze původního inokula; obr. 5.19B).

Vypouklý profil se sníženým okrajovým lemem (obr. 5.19B) je pro silně indukované kolonie typický. Tuto morfologii jsem pozorovala také při indukci šestice kolonií, kdy na kolonie působilo kromě metylaminu rovněž vyšší množství přirozeně produkovaného amoniaku.



**Obr. 5.18.** Morfologie obřích kolonií (BY4742) 34. den kultivace na GM-BKP médiu. Kolonie v kyselé fázi vývoje byly 5 dní indukovány metylaminem, a to různě dlouhou dobu (0 - 30 minut). Kolonie byly indukovány z levé strany, jak naznačují šipky. Na této straně vznikly tmavé skvrny, které jsou důsledkem sražení chloridu vápenatého přítomného v živném médiu při vysokém pH. Na fotografiích je patrný pomalejší růst levé části indukovaných kolonií, buď vlivem vysokého pH nebo kvůli sraženině. Měřítka 5 mm.



**Obr. 5.19.** Morfologie neindukované (A) a silně indukované (B) obřích kolonie. Oblasti, kde je výška kolonie výrazně nižší, jsou na schématu vybarveny šedě.

Při dalším experimentu jsem testovala vliv opakovaných indukcí aplikovaných v různých časech kultivace. Sledovala jsem jejich vliv na morfologii kolonií, což jsem vyhodnocovala na intaktních koloniích i na řezech z kolonií. Současně jsem zjišťovala vliv indukce na expresi

fúzního proteinu Ato1p-GFP (viz kapitola 5.3.4.). Použila jsem kmen BY-Ato1p-GFP; obří kolonie jsem kultivovala v trojicích na GM-BKP médiu.

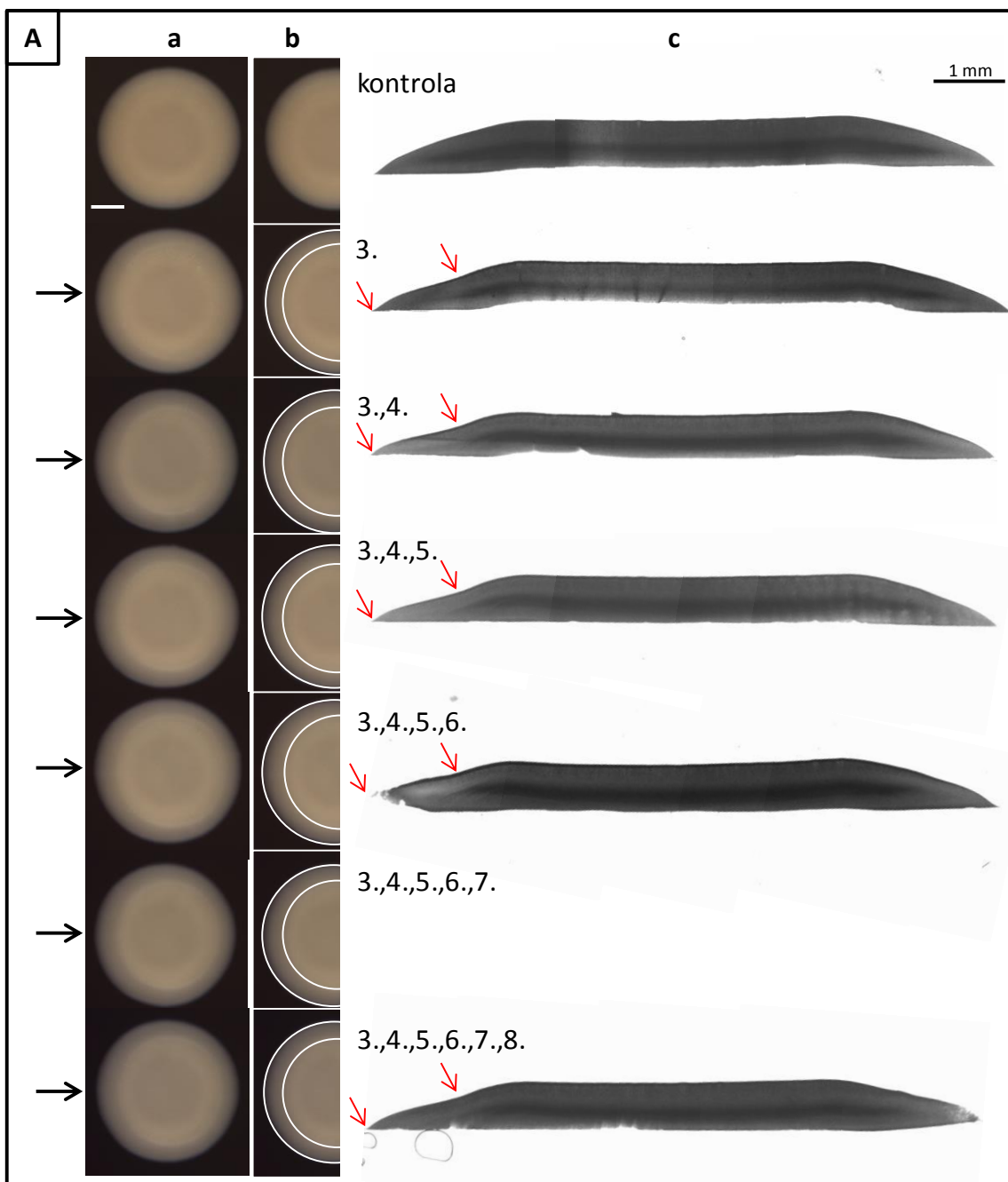
Silnou indukci (30 minut) jsem prováděla různý počet dní (1-6) v období mezi 3. a 8. dnem kultivace, a to vždy ve stejnou denní dobu. 9. den jsem zaznamenala morfologii kolonií. Rovněž jsem připravila tenké řezy, pomocí kterých jsem vyhodnotila diferenciaci uvnitř kolonií a expresi *ATO1*-GFP (viz kapitola 4.2.11 a kapitola 5.3.4.). Hodnotila jsem pouze prostřední kolonii z trojice.

Působením metylaminu vznikla na koloniích ostře ohraničená vypouklá kruhová oblast (vnitřní část kolonie) nápadně vystupující nad nízký okrajový lem kolonie. Na sérii kolonií indukovaných od 3. dne, a to jedenkrát až šestkrát, se ukázalo, že šířka lemu a průměr vnitřní vypouklé oblasti nejsou závislé na počtu provedených indukcí (obr. 5.20A-a,b). Při opakovaných indukcích totiž nedošlo k dalšímu rozšiřování vypouklé oblasti. Na kontrolních neindukovaných koloniích k diferenciaci na vypouklou oblast a lem nedošlo.

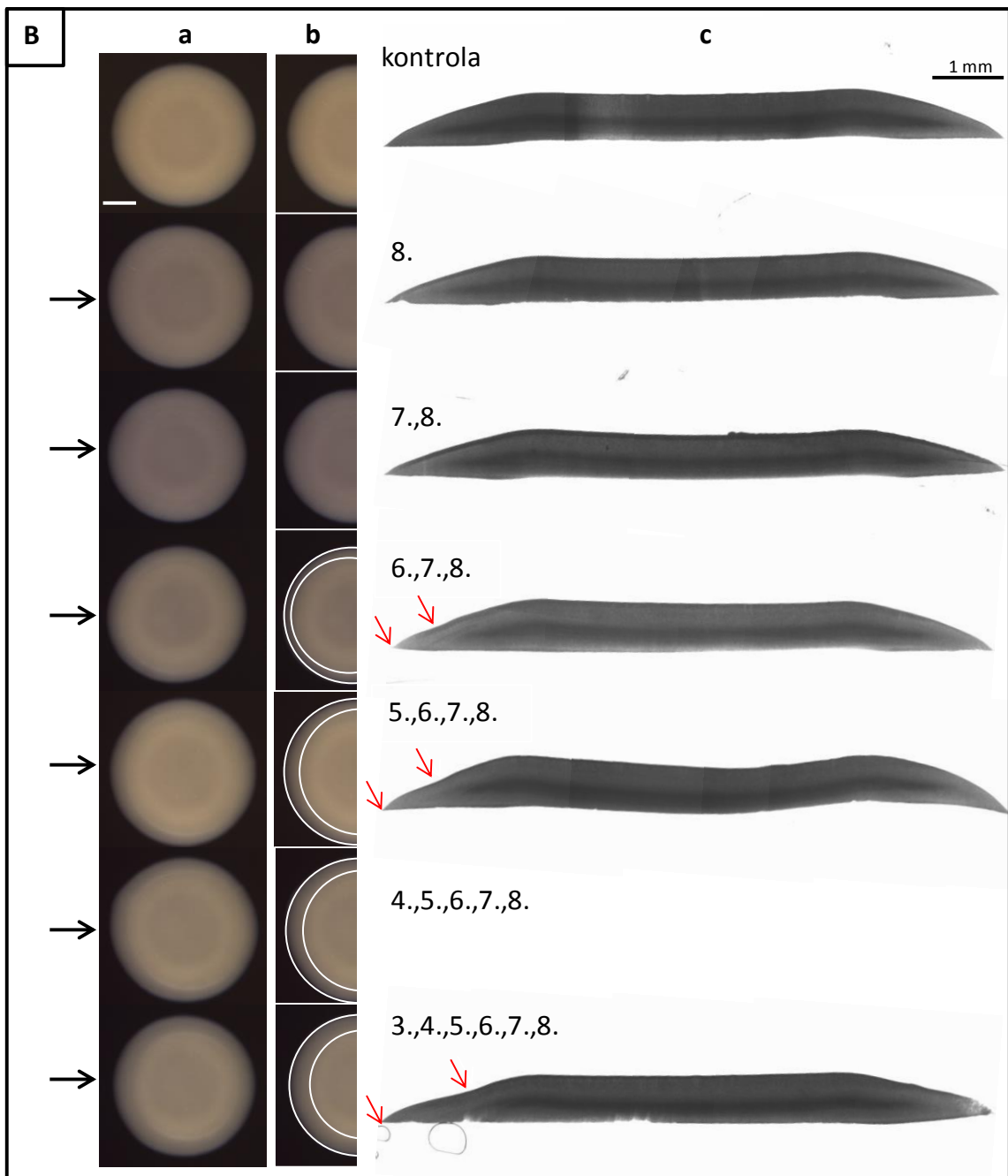
Na koloniích indukovaných 8. den a různý počet dní před 8. dnem (1 až 5 dalších indukcí; obr. 5.20B-a,b) se rovněž vytvořila ohraničená vnitřní vypouklá kruhová oblast a okrajový lem, tentokrát se však lišila šířka okrajového lemu. U kolonie indukované šestkrát (od 3. do 8. dne) byl nejširší, u kolonie indukované třikrát (od 6. do 8. dne) byl nejužší. Na kolonii indukované od 7. do 8. dne ani na kolonii indukované pouze 8. den žádný lem v době vyhodnocení pokusu nebyl. Velikost vypouklé oblasti je tedy tím větší, čím později byla kolonie indukována (čím větší byla kolonie v době první indukce). K diferenciaci na vypouklou oblast a lem nedochází okamžitě, tyto oblasti jsou patrné až 3 dny po indukci. U kolonií indukovaných 8. den a 7. až 8. den se morfologie s lemem vytvořila až po skončení experimentu. Neindukované kolonie byly po celou dobu experimentu vypouklé bez okrajového lemu.

Přítomnost a šířka lemu je dobře patrná na řezech z kolonií. Na obrázcích jsem červenými šipkami vyznačila oblast, která odpovídá plochému okrajovému lemu. Profil indukovaných kolonií není pozvolný. Na rozhraní mezi lemem a vnitřní částí kolonie je nápadný skokový nárůst výšky kolonie (obr. 5.20A-c a 5.20B-c).

Na obrázcích 5.20A a 5.20B je patrné, že celková velikost kolonií není výrazně (negativně) ovlivněna opakovanými indukcemi. Malé rozdíly ve velikostech kolonií jsou dány spíše rozdílnými velikostmi kapek buněčné suspenze nanášených na agar při očkování kolonií. Rovněž je patrné, že hranice mezi vypouklou oblastí a lemem je výraznější na levé straně kolonie, která byla indukována vyšší dávkou metylaminu.



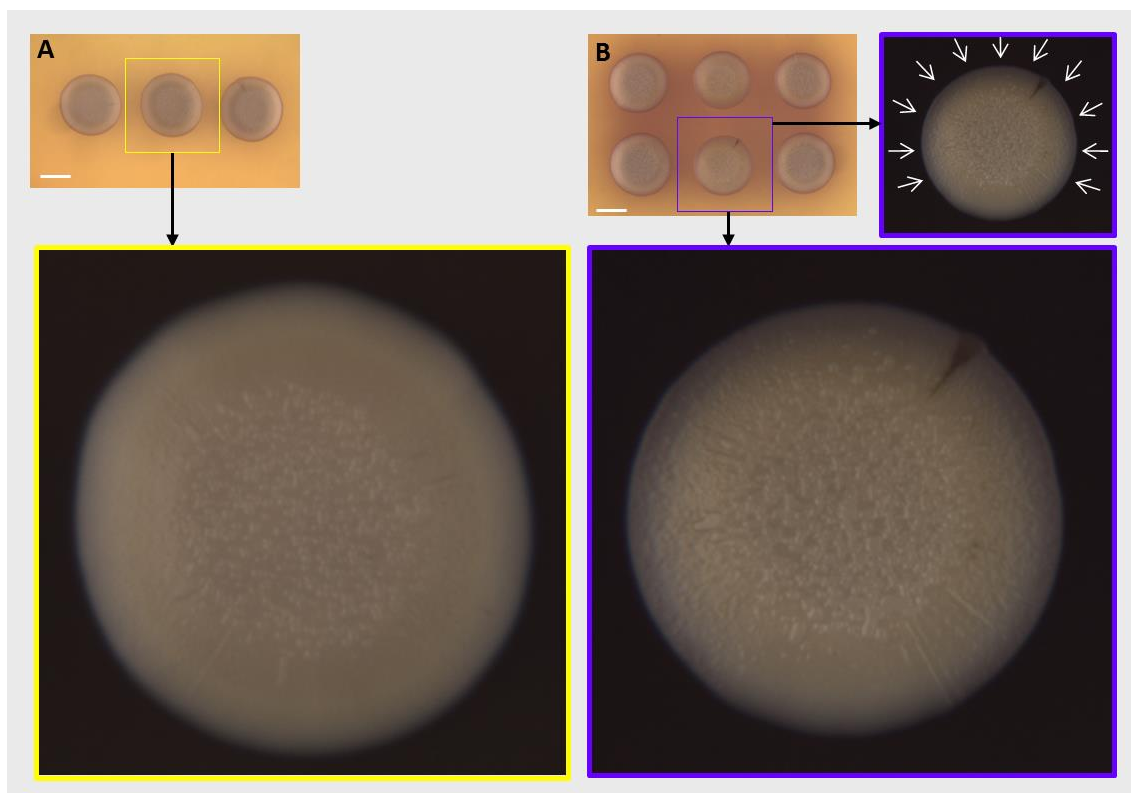
**Obr. 5.20A,B.** Morfologie obřích kolonií kmene BY-Ato1p-GFP kultivovaných 9 dní na GM-BKP médiu a vertikální řezy z těchto kolonií. Kolonie byly v kyselé fázi vývoje mezi 3. a 8. dnem kultivace 30 minut indukovány metylaminem (jednou nebo vícekrát). Dny, ve kterých byly indukce provedeny, jsou vepsány v obrázku u příslušné kolonie a řezu. Kontrola = neindukovaná kolonie. a) Morfologie obřích kolonií. Měřítko 2 mm. b) Levá více indukovaná část kolonie s bíle vyznačeným okrajovým lemem. c) Vertikální řez kolonií (Nomarského kontrast, měřítko 1 mm). Směr působení metylaminu ukazují černé šipky. Červené šipky u každého řezu přibližně vymezují oblast okrajového lemu.



### 5.3.3 VLIV AMONIAKU NA MORFOLOGII KVASINKOVÉ KOLONIE.

Morfologii s vypouklým profilem a nízkým okrajovým lemem jsem pozorovala také u kolonií, které přirozeně produkují větší množství amoniaku, tedy u obřích kolonií procházejících 2. alkalickou fází na GM médiu. Tato morfologie byla nejvýraznější při kultivaci šesti kolonií na jedné misce. Při kultivaci většího množství kolonií na GM médiu totiž dochází mezi koloniemi k vzájemné indukci produkce amoniaku a produkce amoniaku i následná alkalizace média je potom silnější (Palková a Forstová, 2000). Zatímco obří kolonie kmene BY-Ato1p-GFP kultivované 12 dní ve trojicích byly stále v kyselé fázi a neměly nízký okrajový lem (obr. 5.21A), stejně staré kolonie kultivované v šesticích, které již vstoupily do alkalické fáze, byly diferencované na vypouklou vnitřní část a okrajový plochý lem (obr. 5.21B). Na zvětšené kolonii na obrázku 5.21B je patrné, že se nízký okrajový lem nevytvořil kolem celé kolonie, ale pouze v oblastech, které byly vystaveny nejsilnějšímu působení amoniaku. Jsou to místa, která jsou nejbližší okolním koloniím. Bílé šipky na menším obrázku naznačují, z jakých směrů byla kolonie nejsilněji indukována amoniakem produkovaným okolními koloniemi.

Přirozeně produkovaný amoniak tedy ovlivňuje morfologii kolonií podobným způsobem jako metylamin z umělého zdroje.



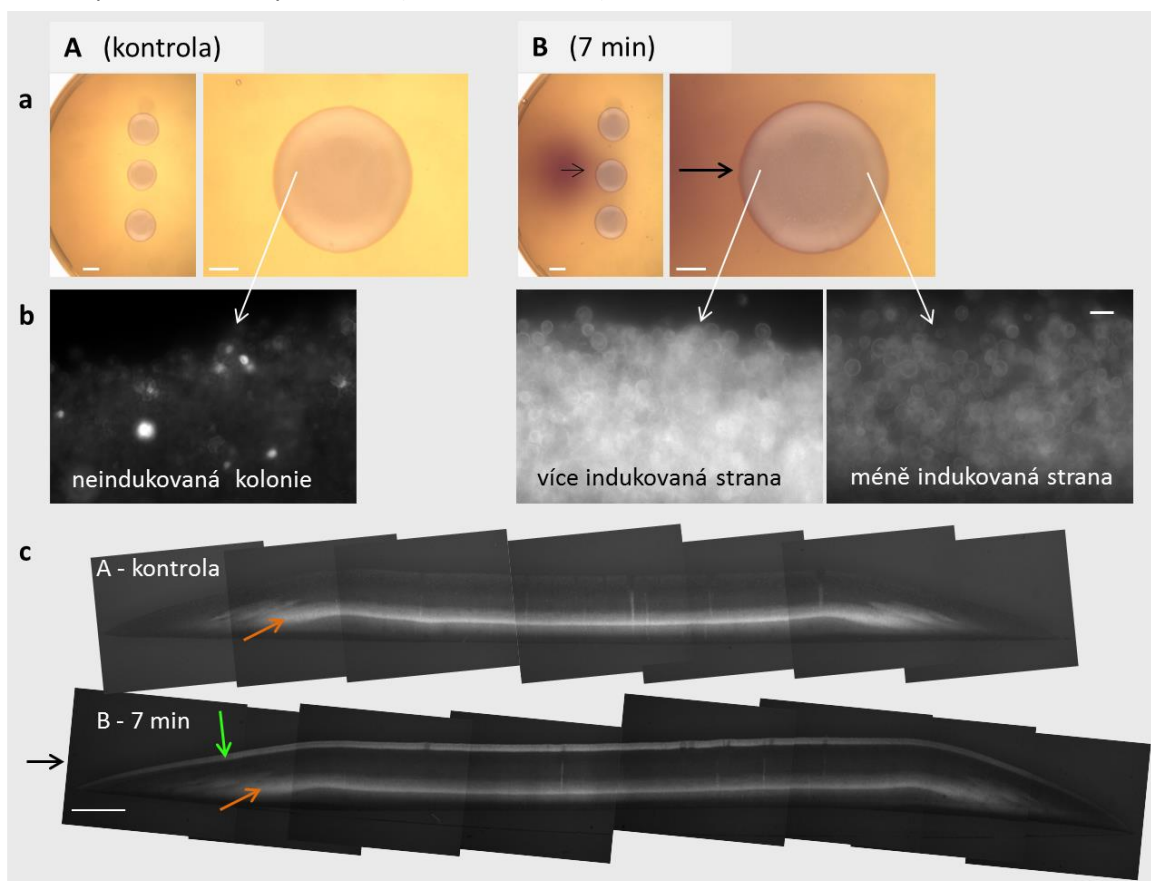
**Obr. 5.21.** Morfologie obřích kolonií kmene BY-Ato1p-GFP 12. den kultivace na GM-BKP médiu. A) Trojice kolonií v kyselé fázi vývoje (žluté zbarvení BKP v médiu). Kolonie mají vypouklý profil bez lemu. B) Šesticice kolonií ve 2. alkalické fázi (fialové zbarvení mezi koloniemi). Kolonie je diferencována na vypouklou vnitřní oblast a úzký nízký okrajový lem. Lem je vytvořen pouze v oblastech, kde je vyšší pH, tj. v oblastech, které jsou nejvíce ovlivněny amoniakem produkovaným okolními koloniemi (viz bílé šipky). Měřítka 5 mm.



### 5.3.4. PŮSOBNÍ METYLAMINU INDUKUJE EXPRESI GENU *ATO1*-GFP

Protein Ato1p je lokalizován v plazmatické membráně buněk (Řiřicová *et al.*, 2007), a funguje pravděpodobně jako permeáza amoniaku (Palková *et al.*, 2002). V době, kdy kolonie rostoucí na GM médiu začínají produkovat amoniak a vstupují do 2. alkalické fáze, se množství tohoto proteinu výrazně zvyšuje (Palková *et al.*, 2002; Řiřicová *et al.*, 2007), a to v buňkách povrchové vrstvy kolonií (Váchová *et al.*, 2009a). Bylo potvrzeno, že exprese genu *ATO1* u mladší kolonie v kyselé fázi může být indukována amoniakem produkovaným sousední starší kolonií (Řiřicová *et al.*, 2007).

Testovala jsem, zda také metylamin může indukovat expresi *ATO1*-GFP v koloniích na GM-BKP médiu. Přítomnost fúzního proteinu Ato1p-GFP jsem sledovala pomocí fluorescenčního mikroskopu na buňkách odebraných z kolonií a na tenkých řezech kolonií. Obří kolonie kmene BY-Ato1p-GFP v kyselé fázi vývoje jsem 7. a 8. den krátce (7 minut) indukovala metylaminem. 9. den jsem u takto indukovaných kolonií pozorovala silnou expresi *ATO1*-GFP v povrchové vrstvě kolonie, a to především na straně, která byla blíže zdroji metylaminu (obr. 5.22B). Oproti tomu u neindukovaných kolonií jsem protein Ato1p-GFP v buňkách nepozorovala vůbec nebo jen velice malé množství (obr. 5.22A). Methylamin tedy indukuje expresi Ato1p-GFP. Při jiném experimentu jsem zjistila, že protein Ato1p-GFP je v indukovaných koloniích přítomen již 6 hodin po indukci metylaminem (data neuvedena).



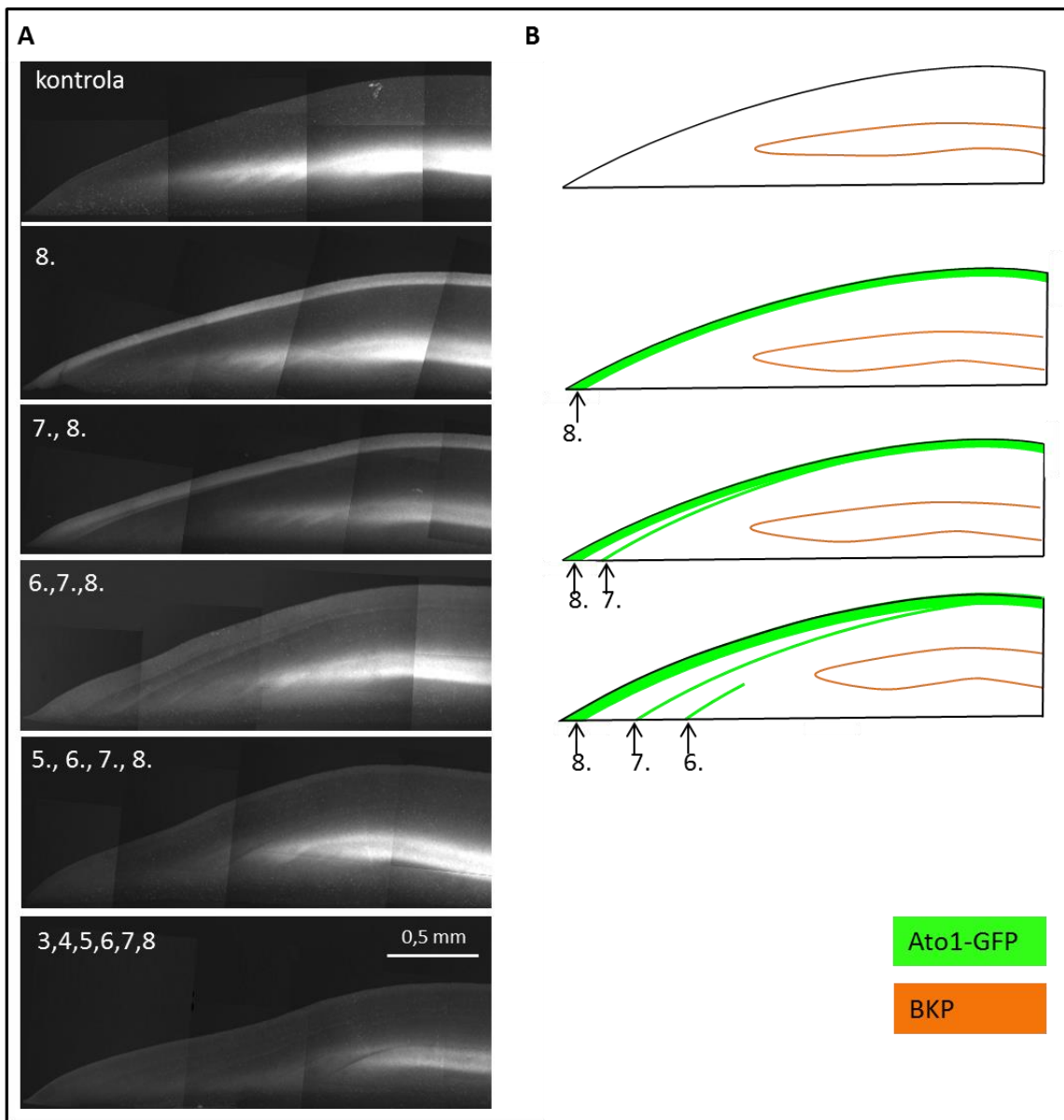
**Obr. 5.22.** Indukce exprese *ATO1*-GFP v obřích koloniích kmene BY-Ato1p-GFP na GM-BKP médiu. A) Kontrolní neindukovaná kolonie 9. den kultivace ještě nevstoupila do 2. alkalické fáze. Signál Ato1p-GFP je velice slabý. B) Kolonie indukovaná 7. a 8. den po dobu 7 minut silně exprimuje *ATO1*-GFP, a to především v levé části kolonie, která byla indukována vyšší dávkou metylaminu. a) Kultivované trojice kolonií (měřítko 5 mm) a detail testované kolonie (prostřední z trojice; měřítko 2 mm). b) Buňky odebrané párátkem z okrajů kolonií (3  $\mu$ m). c) Vertikální řezy z kolonií (měřítko 0,5 mm). Ato1p-GFP je lokalizován pouze v povrchové vrstvě (zelené zbarvení). Signál uvnitř kolonií je BKP (oranžové zbarvení). Barevné šipky ukazují skutečné zbarvení fluorescence. Černé šipky naznačují směr působení metylaminu.

Při dalších experimentech (data neuvedena) jsem indukovala část kolonií amoniakem z umělého zdroje a část kolonií metylaminem a porovnávala jsem účinek těchto dvou látek. Zjistila jsem, že obě látky indukovaly srovnatelně silnou expresi *ATO1*-GFP v povrchové vrstvě kolonií. Rovněž tloušťka této vrstvy byla srovnatelná. Účinek metylaminu je tedy obdobný jako účinek amoniaku.

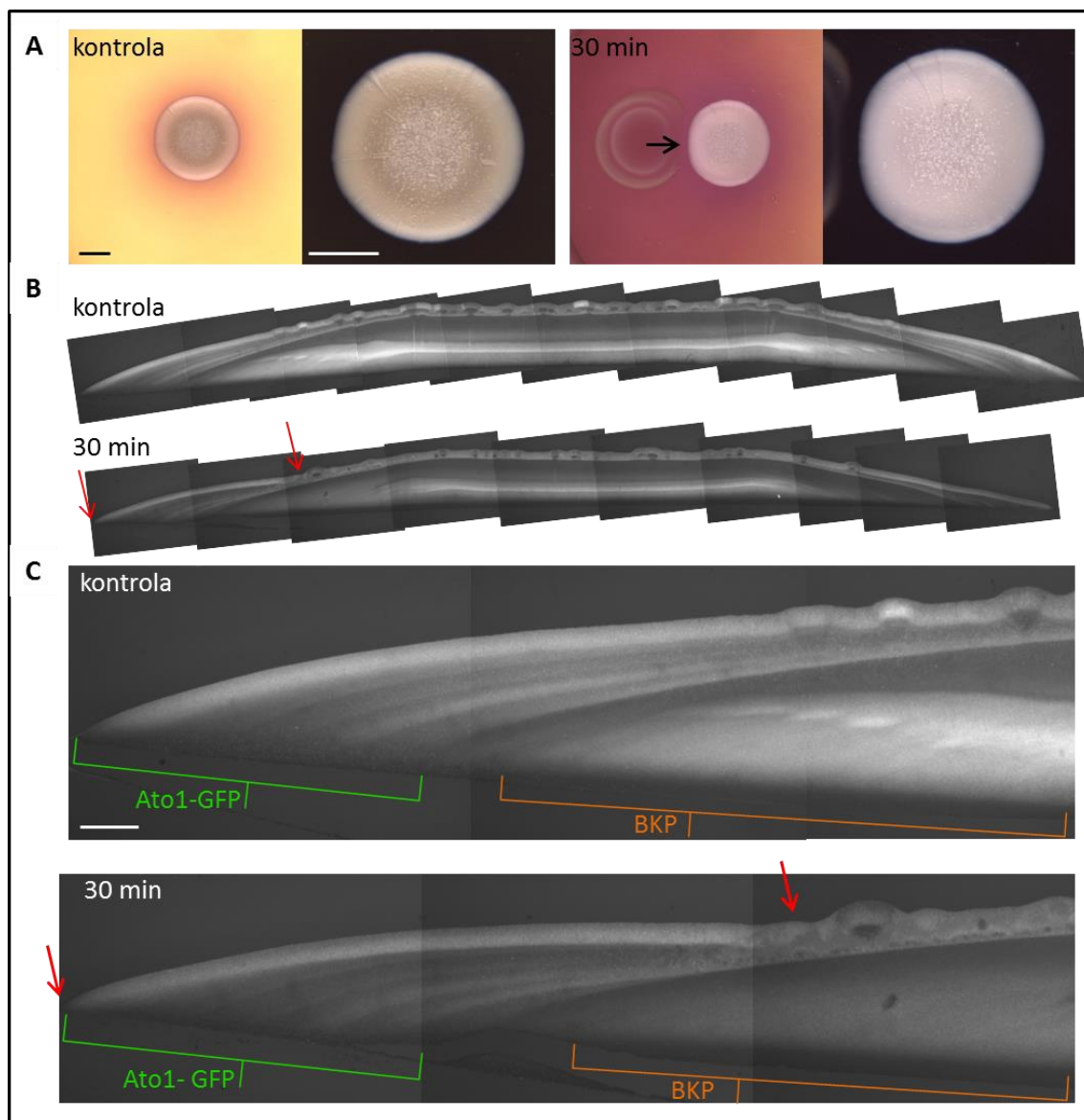
Zajímavý byl vliv opakovaných indukcí metylaminem. Při experimentu popsáném v kapitole 5.3.2. (obr. 5.20) jsem obří kolonie kmene BY-Ato1p-GFP rostoucí na GM-BKP médiu indukovala několik dní za sebou. Na vertikálních řezech jsem potom 9. den sledovala lokalizaci buněk exprimujících *ATO1*-GFP uvnitř kolonie (obr. 5.23). U každého řezu na obrázku 5.23 je uvedeno, ve kterých dnech jsem příslušnou kolonii indukovala. Na řezech je patrné, že se po opakovaných indukcích vytvořilo více zeleně fluoreskujících vrstev tvořených buňkami, které produkují Ato1p-GFP. Kolonie indukované 8. den vytvořily 1 vrstvu, kolonie indukované 7. - 8. den 2 vrstvy a kolonie indukované 6. - 8. den vytvořily 3 vrstvy. Počet vrstev tedy odpovídal počtu indukcí. Dále platilo, že čím více indukcí bylo provedeno, tím slabší byla pozorovaná fluorescence. V souladu s tím byla fluorescence u kolonií indukovaných 5. - 8. den a u kolonií indukovaných 3. - 8. den velice slabá a jednotlivé vrstvy byly jen stěží rozpoznatelné (obr. 5.23). Podobná byla situace u kolonií indukovaných 3. den, u kolonií indukovaných 3. - 4. den, u kolonií indukovaných 3. - 5. den a u kolonií indukovaných 3. - 6. den. Nepozorovala jsem více vrstev, fluorescence byla velmi slabá nebo nebyla zachycena vůbec (data neuvedena).

Na snímcích řezů kolonií pořízených při dalším experimentu je dobře patrný ostře ohraničený okrajový lem (je vymezen červenými šipkami na obr. 5.24B,C) u kolonie opakovaně indukované metylaminem. Kolonie jsem fotografovala až 19. den kultivace, tedy v období přirozené druhé alkalické fáze, kdy již buňky kolonie samy produkují amoniak. Na snímku kontrolní neindukované kolonie je proto vidět přítomnost permeázy Ato1-GFP v povrchové vrstvě kolonie jako důsledek vlivu amoniaku (obr. 5.24B,C).

Protein GFP patří mezi fluorofory, u nichž se intenzita fluorescence mění v závislosti na pH (Tsien, 1998). Abych ověřila, že výraznější fluorescence proteinu Ato1p-GFP na indukované straně kolonie je způsobena vyšší koncentrací Ato1p-GFP a ne pouze vyšší intenzitou fluorescence GFP, nechala jsem na řezy z kolonií několik minut působit 1 M pufr Tris-pH7 a teprve potom připravila mikroskopické preparáty. Řezy s upraveným pH vykazovaly stejný rozdíl ve fluorescenci indukované a neindukované strany kolonie (data neuvedena), což potvrdilo, že metylamin stejně jako amoniak indukuje expresi *ATO1*-GFP.



**Obr. 5.23.** Lokalizace buněk exprimujících *ATO1*-GFP na vertikálních řezech obřích kolonií kmene BY-*Ato1p*-GFP kultivovaných 9 dní na GM-BKP médiu. Kolonie byly v kyselé fázi vývoje mezi 3. a 8. dnem kultivace 30 minut indukovány metylaminem (jednou nebo vícekrát). Dny, ve kterých byly indukce provedeny, jsou vepsány v obrázku u příslušného řezu. Kontrola = neindukovaná kolonie. A) Indukovaná strana vertikálního řezu kolonií (měřítko 0,5 mm). B) Schéma řezů s odlišením zelené (signál *Ato1p*-GFP) a oranžové fluorescence (BKP). Počet zeleně fluoreskujících vrstev odpovídá počtu provedených indukcí.



**Obr. 5.24.** Expres *ATO1*-GFP v oběh koloniích kmene BY-Ato1p-GFP 19. den kultivace na GM-BKP médiu (1 kolonie na misce). „kontrola“= kolonie procházející přirozenou 2. alkalickou fází (produkuje amoniak). „30 minut“= kolonie indukovaná osmkrát (4. - 11. den) 30 minut metylaminem. A) Alkalizace okolí obřích kolonií a morfologie stejných kolonií při větším zvětšení (měřítko 5 mm). Tmavé kruhové skvrny v blízkosti indukované kolonie vznikly sražením chloridu vápenatého v živném médiu. Černá šipka naznačuje směr působení metylaminu. B) Vertikální řezy z kolonií. C) Detail řezů z kolonií (měřítko 25  $\mu$ m). Ato1p-GFP je lokalizován pouze v povrchových vrstvách kolonií. Signál uvnitř kolonií odpovídá BKP (podobná lokalizace jako na obr. 5.23). Červené šipky u indukovaného řezu přibližně vymezují oblast okrajového lemu.

### 5.3.5 DISKUZE

---

Zjistila jsem, že metylamin působí na kvasinkové kolonie rostoucí na komplexním médiu s glycerolem podobně jako amoniak přirozeně produkováný během druhé alkalické fáze vývoje kolonií (Palková *et al.*, 1997).

Působení metylaminu změnilo morfologii obří kolonie. Vyšší dávka metylaminu, stejně jako amoniak produkováný koloniemi během druhé alkalické fáze, byly příčinou vzniku vypouklé morfologie s nízkým okrajovým lemem (obr. 5.20, obr. 5.21). Viditelný okrajový lem se vytvořil do tří dnů po indukci kolonií. Čím mladší byla indukovaná kolonie, tím širší lem se později vytvořil (obr. 5.20B). Hranice okrajového lemu byla dobře zřetelná; navazující vnitřní oblast kolonie nápadně strmě stoupala (obr. 5.20, obr. 5.24). Je možné, že indukce metylaminem či amoniakem ovlivňuje růst kolonií tím způsobem, že buňky ve vnitřní části kolonie se náhle začnou množit relativně pomaleji oproti buňkám v okrajové části kolonie. Odlišný vliv metylaminu na buňky v různých částech kolonie (vnitřní část a okrajová část) může být způsoben odlišným fyziologickým stavem těchto buněk, který je důsledkem například nestejně dostupnosti živin. Možnost, že buňky na okraji kolonií mohou být v jiném fyziologickém stavu než buňky více vzdálené od živného média (střed kolonie) není nijak překvapivá. Zajímavá však je existence ostré hranice mezi buňkami okrajové a středové části. Takováto hranice pravděpodobně není projevem postupně se snižující koncentrace živin, ale svědčí spíše o diferenciaci buněk v kvasinkové kolonii, o existenci různých subpopulací buněk se specifickými vlastnostmi.

Rozdílné vlastnosti buněk odebraných z okraje obřích kolonií a ze středu kolonií byly popsány již dříve. Například Váchová *et al.* (2009b) popsala rozdílnou expresi některých genů ve středové a obvodové části kolonií. Například permeáza Ato1p byla produkována ve vyšším množství na obvodu kolonie než v jejím středu. V mnoha případech počátek této diferenciaci časově odpovídal vstupu kolonie do druhé alkalické fáze (přibližně 10. den kultivace).

Zajímavé je, že opakované indukce v dalších dnech už na morfologii rostoucích kolonií žádný viditelný vliv neměly. Jednou změněná morfologie se už dále neměnila. Přestože u indukovaných kolonií došlo k omezení růstu kolonie do výšky (v okrajové části), růst kolonie do plochy ovlivněn nebyl. Ani mnohokrát opakované indukce nezpůsobily zmenšení velikosti kolonie oproti kontrolní neindukované kolonii (obr. 5.20). Použité dávky metylaminu rovněž nezpůsobily zvýšený výskyt mrtvých či poškozených buněk (obarvených bromkresolovým purpurem) v koloniích při žádném z experimentů (obr. 5.22, obr. 5.23, obr. 5.24). Protože opakované indukce metylaminem nezpůsobily ani zvětšení velikosti kolonie, nepoměr růstové rychlosti ve vnitřní a okrajové části byl způsoben spíše zpomalením růstu ve vnitřní části než zrychlením růstu v okrajových částech. Je tedy možné, že metylamin způsobil zpomalení nebo zastavení růstu určité subpopulace buněk ve vnitřní části kolonie. To by vysvětlovalo, proč opakované indukce již morfologii kolonií dále neovlivňovaly. Je možné, že buňky vnitřní části byly ovlivněny již při první indukci a nové buňky přirůstající v dalších dnech na okraji kolonie na další prováděné indukce metylaminem nereagovaly.

Již dříve byl popsán inhibiční efekt amoniaku na růst kvasinkových kolonií. Palková *et al.* (1997) popsala, že růst obřích kolonií je dočasně inhibován na počátku druhé alkalické fáze, tedy v době, kdy buňky začínají produkovat amoniak (Palková *et al.*, 1997). V další práci (Váchová a Palková, 2005) byly sledovány markery apoptózy v různých částech kolonií a bylo zjištěno, že buňky v mladších obřích koloniích (stáří 5 dní) jak z centra, tak z obvodu vykazovaly časné markery apoptózy (ROS, zlomy DNA). Další znaky apoptózy se vyvíjely v následujících dnech (8. – 12. den) především v centru kolonií, na obvodu kolonií naopak postupně ubývaly. Konečné znaky apoptózy a výskyt permeabilizovaných buněk byly 21. den kultivace výrazně vyšší v centrální části oproti obvodové oblasti. Lokalizace apoptózy do centra kolonie umožňuje zbytku populace využít uvolněné živiny pro svůj další růst. Pokles výskytu markerů apoptózy na

obvodu kolonií souvisí s produkcí amoniaku; dochází k němu totiž především v období počínající produkce amoniaku. Souvislost produkce amoniaku s lokalizací apoptózy do centra kolonií dále podpořily pokusy s kmenem s deletovaným genem pro transkripční faktor Sok2p, který neprodukuje amoniak (Váchová *et al.*, 2004). U kolonií tohoto kmene probíhá apoptóza v celé kolonii a kolonie má sníženou životaschopnost (Váchová a Palková, 2005).

Zatímco změna morfologie kolonie byla patrná až několik dní po působení metylaminu, silnou produkci proteinu Ato1p-GFP indukovanou metylaminem jsem pozorovala mnohem dříve (6 hodin po indukci). Srovnatelnou produkci Ato1p-GFP jsem uměle vyvolala rovněž amoniakem. V obou případech jsem na koloniích pozorovala souvislou povrchovou vrstvu buněk produkujících Ato1p-GFP, přičemž signál GFP byl vždy silnější na té straně kolonie, která byla blíže zdroji amoniaku či metylaminu (obr. 5.22).

Při opakovaných indukcích metylaminem (několik dní za sebou) jsem na řezech kolonií pozorovala více ostře ohraničených vrstev silně exprimujících *ATO1*-GFP, které jsou oddělené vrstvou buněk se slabším signálem Ato1p-GFP. Protože je často možné přiřadit konkrétní vrstvy k příslušným indukcím (obr. 5.23), můžeme rozpoznat přírůstek kolonie za určité období. Zároveň je zřejmé, že exprese *ATO1*-GFP po indukci metylaminem je jen přechodná. Více souvislých koncentrických vrstev produkujících Ato1p-GFP bylo pozorováno také u hustě vysetých monokolonií, které vstoupily do alkalické fáze vývoje (3. a 4. den; Váchová *et al.*, 2009a).

Z provedených experimentů vyplynulo, že účinek metylaminu je obdobný jako účinek amoniaku. Obě látky navozují u kolonií alkalickou fázi, provázenou změnou morfologie kolonií a produkcí domnělé permeázy amonných iontů (Ato1p-GFP). Při experimentech s indukci metylaminem a amoniakem z umělého zdroje jsem ověřila, že účinek stejné dávky obou látek (300 mM koncentrace, 30 min působení) na kvasinkové kolonie je podobný. Amoniak a metylamin v této koncentraci ovlivnil kvasinkové kolonie s podobnou intenzitou jako amoniak přirozeně produkovaný trojicemi obřích kolonií během druhé alkalické fáze.

Amoniak působí u kvasinek jako signální molekula (Palková *et al.*, 1997). Do kvasinkových buněk se dostává prostou difúzí přes buněčné membrány (Bogonez *et al.*, 1983). Mechanismus působení amoniaku zatím není znám, ale patrně ovlivňuje chování buněk prostřednictvím změny pH jejich intracelulárního prostředí (Palková a Váchová, 2003). To je v souladu s mým zjištěním, že amoniak i metylamin mají podobný účinek. Hypotézu potvrzují další výsledky naší laboratoře popisující změny pH v buňkách kolonií, které se nacházejí ve druhé alkalické fázi a produkují amoniak. V cytoplazmě těchto buněk pravděpodobně existuje pH gradient mezi periferní (pH ~ 8,8) a interní (pH ~ 6,6) oblastí cytoplazmy (Pineda Rodó *et al.*, 2012). Podobný mechanismus účinku amoniaku, konkrétně jeho vliv na změnu pH v kyselých kompartmentech (např. ve vakuolách), je předpokládán u *Dictyostelium discoideum*. (Davies *et al.*, 1993). Amoniak se u *D. discoideum* podílí na několika krocích vývoje mnohobuněčných struktur (pseudoplazmodia a fruktifikačního tělíska) a na regulaci diferenciace buněk uvnitř mnohobuněčných struktur (Gross, 1994).

## 5.4 POUŽITÍ KMENŮ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* S MUTACÍ *ade2* PRO DETEKCI PŘÍTOMNOSTI ŽIVIN

---

Během vývoje kvasinkových kolonií *S. cerevisiae* BY4742 dochází k diferenciaci na minimálně dvě horizontální vrstvy, které se významně odlišují jak morfologií buněk, tak metabolismem (Čáp *et al.*, 2012). Vzhledem k tomu, že je kvasinka *S. cerevisiae* fakultativně aerobní, může tato stratifikace souviset s různými způsoby energetického metabolismu (fermentace nebo aerobní respirace), a může tedy souviset s dostupností kyslíku a s dostupností zdroje uhlíku. V průběhu času totiž v rostoucí kolonii ubývá zdroje uhlíku (nejdříve v horní části kolonie) a snižuje se dostupnost kyslíku do spodních vrstev kolonie (Kamath a Bungay, 1988). Mým cílem proto bylo připravit kmeny schopné detekovat přítomnost kyslíku a dalších živin uvnitř kvasinkové kolonie.

### 5.4.1 PŘÍPRAVA DETEKČNÍCH KMENŮ

---

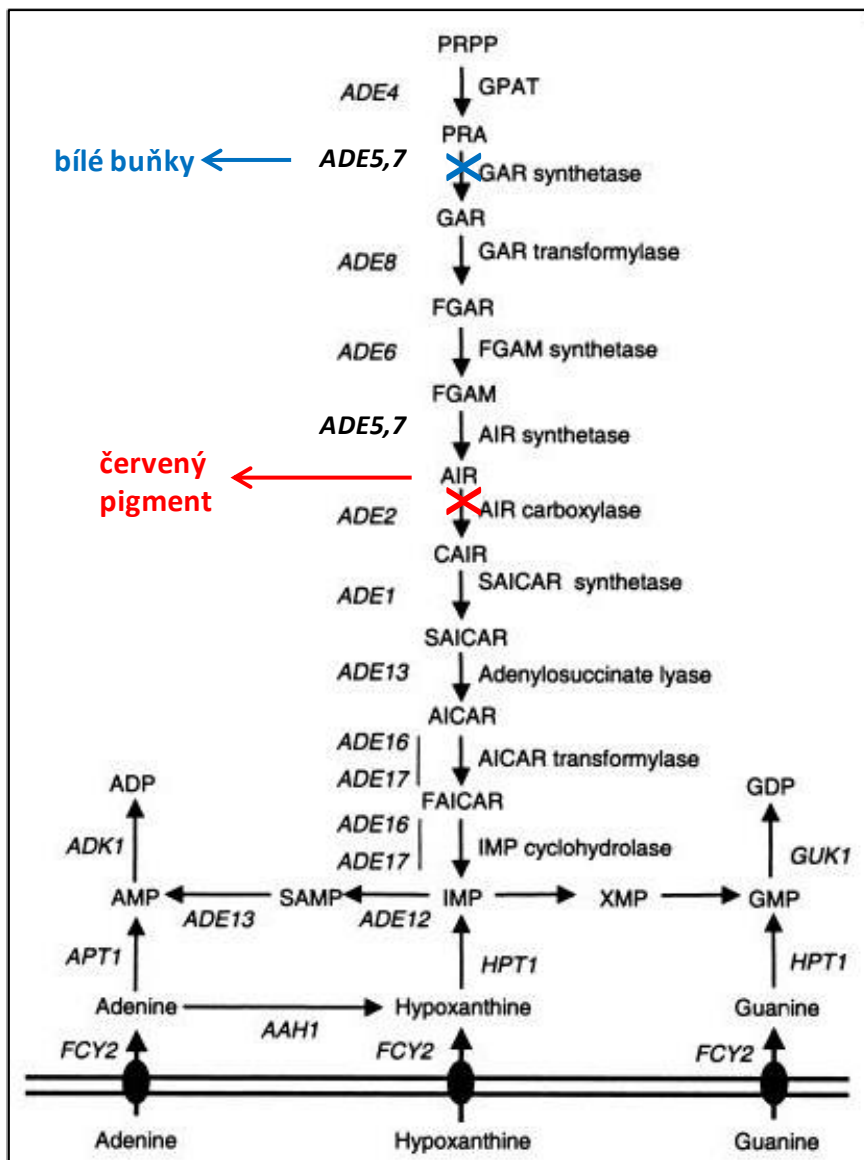
Připravila jsem tři různé detekční kmeny *S. cerevisiae*. Podstatou detekce u těchto kmenů je tvorba červeného pigmentu (tzv. *ade* pigmentu) způsobená delecí genu *ADE2* (Reaume a Tatum, 1949). Kmeny s delecí *ade2* produkují červený pigment pouze při nízké koncentraci adeninu v prostředí a v přítomnosti kyslíku (Smirnov, 1967). Díky dalším modifikacím kmene s delecí *ade2* (vnesení různých indukovatelných promotorů) jsem získala kmeny tvořící červený pigment pouze v přítomnosti konkrétní živiny (galaktózy nebo mědi). Kmeny *ade2* jsou používány pro studium mnoha různých jevů (např. poziční efekt, stabilita plazmidů, funkce mitochondrií, morfologie a dědičnost vakuol); jejich využití pro sledování dostupnosti živin a kyslíku zatím v literatuře popsáno nebylo.

Kmen BS jsem získala delecí genu *ADE2* u kmene *S. cerevisiae* BY4742. Tato delece způsobuje přerušení dráhy biosyntézy purinů (tzv. AMP dráha, obr. 5.25). Nepřítomnost produktu genu *ADE2* (AIR karboxylázy) je příčinou hromadění jejího substrátu AIR (P-ribosylaminoimidazol). Za podmínek oxidativního metabolismu se intermediát AIR mění na červený pigment, který se hromadí ve vakuolách (Weisman *et al.*, 1987). Kvasinkové buňky s delecí *ade2* jsou červené, pokud respirují a rostou na živném médiu s nedostatkem adeninu. Pokud stejné buňky kultivujeme na živném médiu s dostatkem adeninu, dochází ke zpětnovazebné inhibici proteinu Ade4p (první protein v AMP dráze) koncovými produkty ADP a ATP. AMP dráha se proto nespouští, nedochází tedy ani k hromadění AIR intermediátu a ve výsledku jsou buňky a kolonie bílé. Kmen BS se tedy při kultivaci na médiu s omezeným množstvím adeninu (YEPG médium) zbarvuje dočervena a na médiu s nadbytkem adeninu (YEPG80ade) je bílý (obr. 5.26).

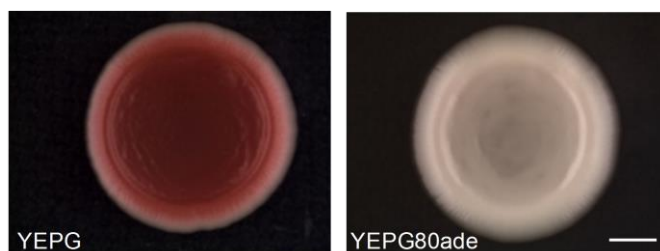
Kmen BS s delecí *ade2* jsem dále upravila vnesením promotoru indukovatelného  $\text{Cu}^{2+}$  ionty (promotor *CUP1*) před gen *ADE5,7* (produkt tohoto genu se uplatňuje na počátku AMP dráhy; obr. 5.25). Výsledný kmen BSCu spouští AMP dráhu pouze v přítomnosti  $\text{Cu}^{2+}$  iontů. V přítomnosti  $\text{Cu}^{2+}$  tedy dochází k hromadění intermediátu AIR a k červenému zbarvení. Pokud  $\text{Cu}^{2+}$  ionty v kultivačním médiu nejsou, protein Ade5,7p nevzniká a dráha je zastavena dříve, než může vzniknout AIR intermediát. Kvasinkové buňky zůstávají bílé (obr. 5.35-BSCu).

Obdobným způsobem jsem připravila kmen *S. cerevisiae* BSGal, který detekuje přítomnost galaktózy v médiu. Do kmene s delecí *ade2* jsem tentokrát vnesla promotor *GAL1*. Umístila jsem ho opět před gen *ADE5,7*. Buňky tohoto kmene jsou červené pouze v přítomnosti galaktózy (obr. 5.27).



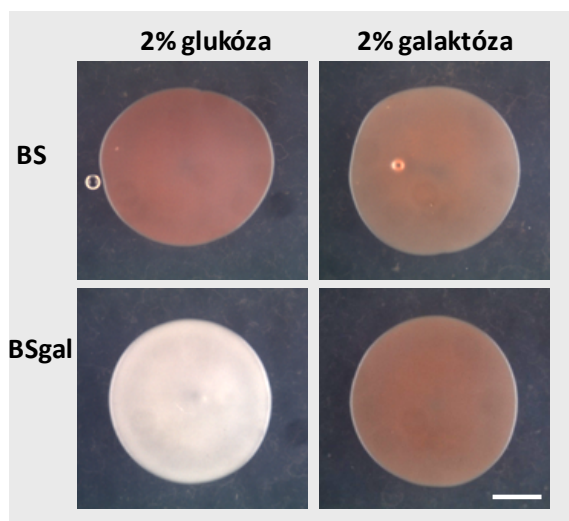


**Obr. 5.25.** Dráha biosyntézy purinů (AMP dráha). Delece genu *ADE2* způsobí zčervenání buněk. Absence produktu genu *ADE5,7* znemožní tvorbu červeného ade pigmentu. (Upraveno podle Rébora *et al.*, 2001).



**Obr. 5.26.** Obří kolonie *S. cerevisiae* BS rostoucí 3 dny na agarových médiích s omezeným množstvím adeninu (YEPG) a s nadbytkem adeninu YEPG80ade. Měřítka 2 mm.





**Obr. 5.27.** Zbarvení buněk BS a BSgal po kultivaci na médiu bez galaktózy a na médiu s galaktózou. Hustou suspenzi buněk narostlých na médiu YEPG80ade jsem zaočkovala na pevná média bez adeninu (SD s 2% glukózou, SDgal s 2 % galaktózou) a kultivovala 16 hodin. Kontrolní kmen BS zčervenel na obou médiích. Kmen BSgal zčervenel pouze médiu s galaktózou. Měřítko 2 mm.

Protože k tvorbě červeného pigmentu dochází pouze za podmínek oxidativního metabolismu, červené zbarvení všech výše popsaných kmenů (BS, BSCu a BSgal) zároveň indikuje přítomnost kyslíku (tab. 5.5).

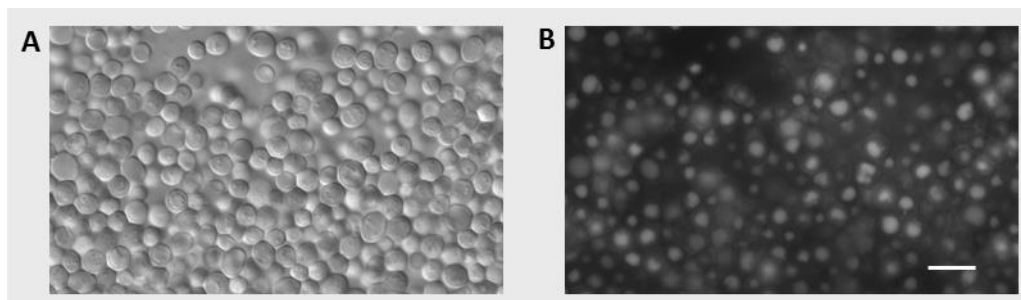
kmen	nadbytek adeninu	nízká hladina O <sub>2</sub>	nízká hladina adeninu a vysoká hladina O <sub>2</sub>			
			+ gal	- gal	+ Cu <sup>2+</sup>	- Cu <sup>2+</sup>
BS ( <i>ade2Δ</i> )						
BSCu ( <i>ade2Δ</i> , P <sub>CUP</sub> -ADE5,7)						
BSgal ( <i>ade2Δ</i> , P <sub>GAL</sub> -ADE5,7)						

**Tab. 5.5.** Přehled připravených detekčních kmenů s informací o jejich zbarvení za různých kultivačních podmínek (nadbytek adeninu; kultivace za sníženého přístupu kyslíku, přidavek galaktózy nebo Cu<sup>2+</sup> do média).

Produkce ade pigmentu jednotlivými buňkami je za vhodných podmínek velmi silná, barvivo se hromadí ve vakuolách a není odbouráváno anebo je odbouráváno jen velmi pomalu. Při pučení se dostává s částí vakuoly do dceřiné buňky (Weisman *et al.*, 1987). Zbarvení kolonií je proto velmi výrazné. Při pozorování buněk ve světelném mikroskopu, je možno sledovat velké naplněné vakuoly i červené zbarvení jejich obsahu. Ade pigment je zároveň fluorofores s maximem fluorescence při 520 nm (Nevzglyadova *et al.*, 2011; obr. 5.28B). Díky tomu můžeme zaznamenat počínající tvorbu ade pigmentu už v době, kdy je červené zbarvení ještě okem nepostřehnutelné.

Ověřila jsem, že kmeny detekující Cu<sup>2+</sup> ionty mohou být připraveny i jinými modifikacemi AMP dráhy. Stejný účinek jako delece genu *ADE2* má delece genu *ADE1* a stejný účinek jako

vložení promotoru *CUP1* před gen *ADE5,7* má vložení promotoru *CUP1* před gen *ADE4* (data neuvedena).

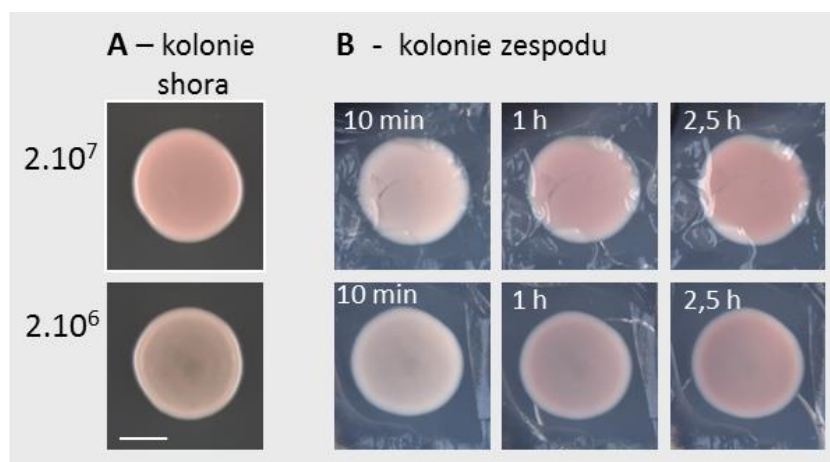


**Obr. 5.28.** Buňky z horní vrstvy kolonie (detail vertikálního řezu) s nahromaděným fluorescenčním ade pigmentem ve velkých vakuolách ve světelném mikroskopu s Nomarského kontrastem (A) a ve fluorescenčním mikroskopu (B). Měřítka 5  $\mu\text{m}$ .

## 5.4.2 MONITOROVÁNÍ PŘÍTOMNOSTI KYSLÍKU A ŽIVIN UVNITŘ KVASINKOVÝCH KOLONIÍ

### 5.4.2.1 Detekce dostupnosti kyslíku a adeninu v obřích koloniích

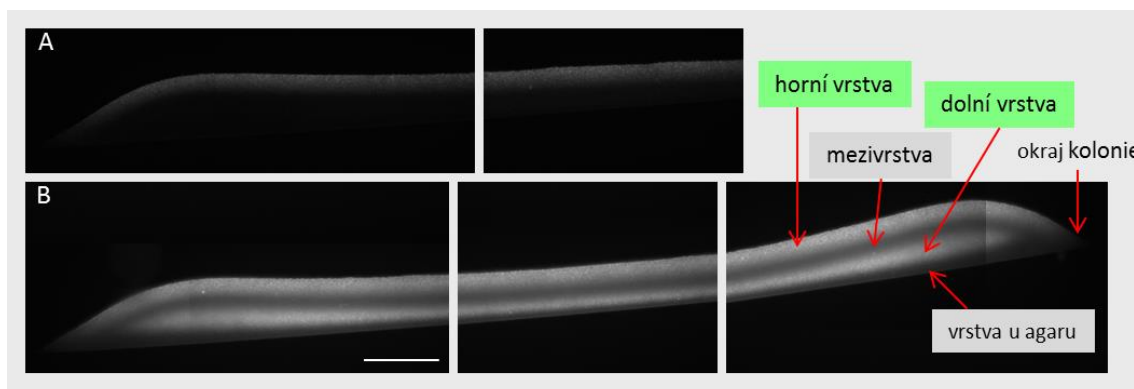
Povrch obřích kolonií kmene BS rostoucích na komplexním YEPG médiu již po jednodenní kultivaci mírně zčervená (obr. 5.29A). To je důsledek spouštění AMP dráhy (obr. 5.25) a zároveň potvrzení, že v buňkách na povrchu kolonie je dostatek kyslíku.



**Obr. 5.29.** Jednodenní obří kolonie *S. cerevisiae* BS rostoucí na komplexním YEPG médiu lišící se množstvím buněk v inokulu ( $2 \times 10^7$  nebo  $2 \times 10^6$  buněk na kolonii). Kolonie byly vyfotografovány nejprve shora (A) a potom zespodu (B), a to 10 minut, 1 hodinu a 2,5 hodiny po sejmutí z agarového média. Spodní strana kolonií se postupně zbarvovala dočervena (tvořil se zde ade pigment). Měřítka 3 mm.

Abych zjistila, zda je dostatek kyslíku i uvnitř jednodenních kolonií, připravila jsem vertikální řezy těchto kolonií. Na řezech o tloušťce 50  $\mu\text{m}$  jsem sledovala fluorescenci ade pigmentu v různých vrstvách a částech kolonie. Na čerstvém řezu jsem zaznamenala fluorescenci v povrchové vrstvě kolonie (obr. 30A). Následující řez jsem nechala 1 hodinu na vzduchu a teprve potom jsem připravila mikroskopický preparát. Ukázalo se, že po 1 hodině působení

kyslíku fluorescence v horní vrstvě zesílila a zároveň se objevila silná fluorescence v dolní vrstvě kolonie. Mezi horní a dolní vrstvou zůstala mezivrstva bez fluorescence. Tenká vrstva u agaru zůstala rovněž bez fluorescence stejně jako okraj kolonie (obr 5.30B).



**Obr. 5.30.** Fluorescence ade pigmentu na vertikálních řezech o tloušťce 50  $\mu\text{m}$  z jednodenní kolonie *S. cerevisiae* BS rostoucí na YEPG médiu. A) Čerstvý řez. B) Řez vystavený působení kyslíku po dobu 1 hodiny. Měřítka 0,5 mm.

Z výsledků je zřejmé, že ke spouštění dráhy biosyntézy adeninu (AMP dráhy) dochází v kolonii ve dvou různých vrstvách. Přitom v povrchové vrstvě se to děje za aerobních podmínek, protože zde dochází k okamžité produkci ade pigmentu (ještě v intaktní kolonii). Oproti tomu v dolní vrstvě je koncentrace kyslíku podstatně nižší (nebo nulová), protože ade pigment vznikne až po působení vzdušného kyslíku na rozříznutou kolonii. V tenké vrstvě u agaru a na okraji kolonie dráha biosyntézy adeninu není spouštěna. Důvodem by mohl být dostatečný přísun adeninu z živného média.

Zjištění, že v dolní vrstvě dochází ke spouštění AMP dráhy, a to při nedostatku kyslíku, potvrdil také další pokus. Jednodenní růžové kolonie kmene BS (produkující ade pigment v horní vrstvě) jsem zalila do agaru a poté vyjmula z původního živného média. Odhalila jsem tak spodní část kolonie a vystavila ji působení kyslíku. Spodní část kolonií byla ihned po vyjmutí téměř bílá, po 1 hodině na vzduchu byla zřetelně růžová s bílým okrajem. Po delší době bylo zbarvení ještě výraznější (obr. 5.29B). Experiment potvrdil, že se ve spodní části kolonie během kultivace nahromadil meziprodukt přerušené AMP dráhy, který po 1 hodině působení kyslíku zčervenal. Zbarvení ade pigmentu je natolik výrazné, že je viditelné i přes tenkou vrstvu nezbarvených buněk (vrstva u agaru). U buněk v okrajových částech kolonie ke spuštění AMP dráhy nedošlo, což souhlasí s pozorováním na tenkých řezech.

Při dalším pokusu jsem v průběhu 6 dnů sledovala vývoj horizontálních vrstev v obích koloniích kmene BS kultivovaných na YEPG médiu a také na médiu s nadbytkem adeninu (YEPG80ade). Kolonie rostoucí na YEPG80ade mi (alespoň v prvních 2 dnech kultivace) posloužily jako kontrola neprodukcující ade pigment. Opět jsem sledovala čerstvé vertikální řezy a porovnávala je s řezy vystavenými po dobu jedné hodiny působení kyslíku. Při kultivaci na YEPG (data neuvedena) byl ade pigment slabě produkován v povrchové vrstvě už 9,5 hodiny po zaočkování. Po 1 dni kultivace byla již kolonie rozčleněna do horizontálních vrstev (s výjimkou okrajových částí kolonie, které jsou v těsné blízkosti agaru) stejně jako v minulém pokusu (obr. 5.30). Na médiu s přídavkem adeninu (YEPG80ade) jsem pozorovala slabou produkci ade pigmentu v horní vrstvě až po 3 dnech. Produkci ade pigmentu v dolní vrstvě jsem nezaznamenala (data neuvedena).

Na obrázku 5.31 jsou schematicky znázorněny horizontální vrstvy opakovaně pozorované u jednodenních kolonií BS rostoucích na YEPG médiu. V celé horní vrstvě byla aktivní AMP dráha. Na čerstvém řezu byl v téměř celém objemu této vrstvy nahromaděn ade pigment, což svědčí o oxidativním metabolismu. Pouze ve spodní části této vrstvy vznikl ade pigment až po

hodinovém působení kyslíku. Buňky ležící v kolonii ve spodní části horní vrstvy tedy spouštějí AMP dráhu za nedostatku kyslíku. Buňky v mezivrstvě adenin nesyntetizovaly. V dolní vrstvě vznikl červený pigment až po hodinovém působení kyslíku. AMP dráha tedy fungovala za nedostatku kyslíku, ale produkce nebyla tak silná jako v horní vrstvě. Vrstva buněk v těsné blízkosti živného média AMP dráhu nespouštěla. Po dvoudenní kultivaci na YEPG byly pozorované vrstvy obdobné.



**Obr. 5.31.** Schéma řezu středovou částí jednodenní kolonie kmene BS rostoucí na YEPG médiu. Zeleně jsou vyznačeny vrstvy, ve kterých je aktivována AMP dráha (a hromadí se meziprodukt AIR). Červeně je vyznačena vrstva s dostatečným přísunem kyslíku, kde vzniká červený pigment (oxidací intermediátu AIR). V šedě označených vrstvách oxidace intermediátu AIR neprobíhá a červený ade pigment nevzniká.

#### 5.4.2.2 Detekce galaktózy

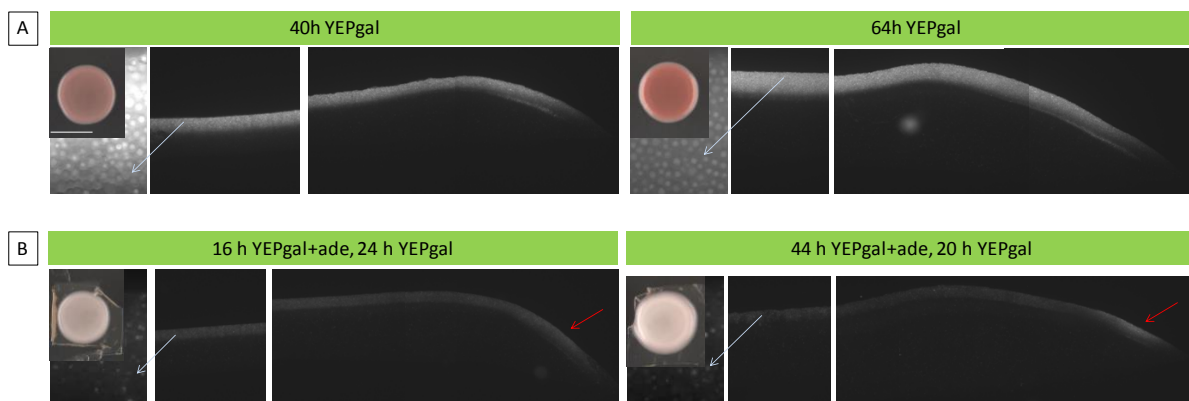
Pomocí vertikálních řezů obřích kolonií kmene BSgal jsem zjišťovala, zda je u jednodenních a starších kolonií dostatek zdroje uhlíku v horní vrstvě buněk. Vyčerpání fermentovatelného zdroje uhlíku vedoucí k přechodu na respirativní metabolismus by totiž mohlo být jednou z příčin členění kolonie do horizontálních vrstev.

Kolonie kmene BSgal, které produkují červený ade pigment pouze v přítomnosti galaktózy (tab. 5.5), jsem kultivovala stejně jako kolonie kmene BS v předchozích experimentech, jen s tím rozdílem, že jsem jako zdroj uhlíku nepoužila glukózu ale galaktózu (médiu YEPgal).

Podobně jako při kultivaci kmene BS na YEPG médiu s glukózou jsem pozorovala v povrchové vrstvě kolonií (horní vrstva) fluorescenci ade pigmentu (obr. 5.32).

Nahromaděný ade pigment není viditelně odbouráván, zůstává ve vakuolách (Weisman *et al.*, 1987). Proto, abych odlišila aktuální produkci ade pigmentu od pigmentu nahromaděného v dřívějších fázích kultivace, některé kolonie jsem na detekční BSgal médium neočkovala přímo, ale přenesla jsem je z jiného média. Na detekční médium jsem přenášela kolonie rostoucí 16 (anebo 44) hodin na médiu s nadbytkem adeninu (YEPgal80ade; obr. 5.32B). Kolonie jsem přenášela na tenké vrstvě agaru odříznuté pomocí žiletky. Po 24 (nebo 20) hodinách kultivace na BSgal jsem sledovala produkci ade pigmentu za uplynulý den. Potvrdilo se, že i dvoudenní kolonie spouští AMP dráhu v celé horní vrstvě a má tedy dostatečný přísun galaktózy. Pouze na okraji kolonie v těsné blízkosti živného média ade pigment produkován nebyl, opět patrně díky přísunu adeninu z média. V přilehlé oblasti (viz červené šipky na obr. 5.32B) byla naopak koncentrace ade pigmentu nejvyšší, což svědčí o rychlém růstu v této oblasti.

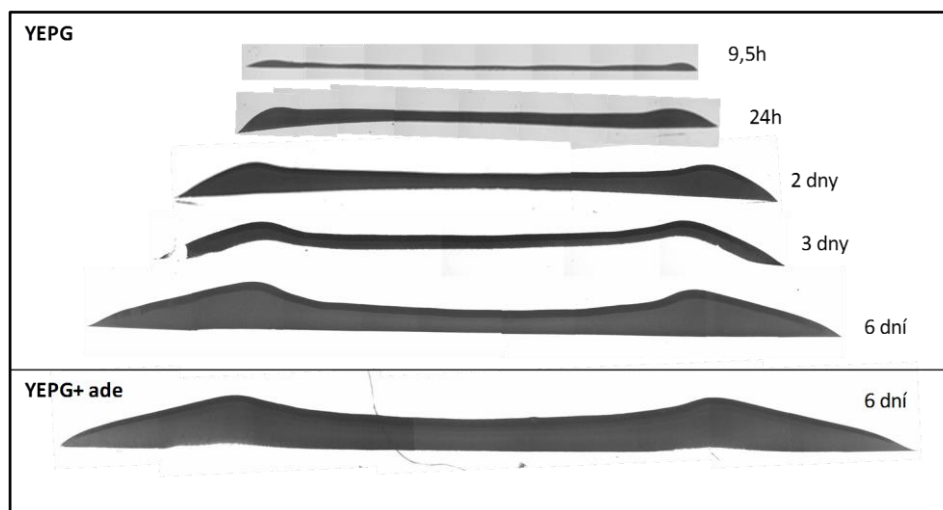
Nedostatek fermentovatelného zdroje uhlíku tedy pravděpodobně není příčinou tvorby horizontálních vrstev.



**Obr. 5.32.** Výskyt ade pigmentu v obřích koloniích *S. cerevisiae* BSGal kultivovaných 40 a 64 hodin na YEPgal médiu (A) a v koloniích kultivovaných nejprve na médiu s nadbytkem adeninu (YEPgal80ade) a potom na médiu YEPgal (B). Na snímcích jsou celé kolonie a vertikální řezy o tloušťce 50  $\mu\text{m}$  (vlevo středová část řezu, vpravo okrajová část řezu). Detaily buněk jsou z horní vrstvy. Červená šipka označuje místo zvýšené metabolické aktivity. Měřítka 5 mm.

#### 5.4.2.3 Diskuze

Při studiu dostupnosti adeninu a kyslíku v obří kolonii rostoucí na YEPG médiu jsem zjistila, že už jednodenní obří kolonie je rozdělena do minimálně 3 horizontálních vrstev. Většina buněk v horní vrstvě má podle očekávání dostatečný přísun kyslíku. Buňky v dolní vrstvě ho mají nedostatek. Dráha biosyntézy adeninu je podle očekávání spouštěna dříve ve vyšších vrstvách než v blízkosti živného média, které je zdrojem určitého množství adeninu (koncentrace adeninu ve složkách YEPG média není známa). Zajímavé však bylo zjištění, že AMP dráha začíná být aktivována již 9,5 hodiny od začátku kultivace. Po 1 dni kultivace je už koncentrace ade pigmentu ve vakuolách velmi vysoká, což svědčí o silné indukci AMP dráhy. Přestože buňky žádný adenin, díky deleci genu *ADE2*, nasyntetizovat nemohou, celkový růst kolonie není minimálně do 6 dne nijak výrazně omezen, což vyplývá ze srovnání s velikostí kolonií rostoucích na komplexním médiu s nadbytkem adeninsulfátu YEPG80ade (obr. 5.33). Aktivace AMP dráhy tedy svědčí o vysoké potřebě adeninu a o pomalém přísunu adeninu do buněk, nesvědčí o jeho absolutním nedostatku.



**Obr. 5.33.** Srovnání relativních velikostí obřích kolonií kmene BS rostoucích na YEPG a YEPG80ade médiu. Řezy z kolonií.

Velmi překvapivá je existence mezivrstvy, ve které žádné buňky nespouštějí AMP dráhu, a to přestože buňky ve vrstvě nad ní (horní vrstva) a zejména buňky ve vrstvě pod ní (dolní vrstva) AMP dráhu spouštějí. Nedá se tedy předpokládat, že buňky mezivrstvy mají dostatečný přísun adeninu z média. Tato neprodukující vrstva je ostře ohraničená a má v celé kolonii (s výjimkou okrajové oblasti kolonie) přibližně stejnou tloušťku. Nicméně tato tloušťka se při různých pokusech liší.

Tvorba horizontálních vrstev v koloniích kmenů odvozených od *S. cerevisiae* BY4742 je v naší laboratoři podrobně zkoumána (Čáp *et al.*, 2012). Byla popsána tvorba dvou ostře ohraničených horizontálních vrstev v oběch koloniích (horní U a dolní L) rostoucích na komplexním médiu s glycerolem (GM). Diferenciace těchto vrstev začíná přibližně 7. den po zaočkování. Buňky z obou vrstev se výrazně liší, a to jak morfologií, tak metabolizmem. Horní buňky aktivují specifický metabolismus kontrolovaný TOR dráhou indukovanou glutaminem, systémem monitorujícím koncentraci aminokyselin (SPS a Gcn4p) a signály z mitochondrií se sníženou respirací. Horní buňky jsou odolné vůči stresu a využívají živiny uvolněné z dolních buněk. Dolní buňky se chovají jako stresované a hladovějící. Aktivují degradativní mechanismy a poskytují živiny horním buňkám.

Čáp *et al.* (2012) popsali u horních U buněk ze sedmidenních a starších kolonií sníženou mitochondriální aktivitu (ztráta většiny krist a nízký mitochondriální membránový potenciál). Oproti tomu L buňky měly dobře vyvinuté kristy a byl detekován mitochondriální membránový potenciál. Z porovnání transkriptomů U a L buněk 15. nebo 20. den kultivace vyplynulo, že L buňky zvýšeně exprimují geny podílející se na biogenezi mitochondrií a oxidativní fosforylaci. Zdá se tedy, že mají přístup ke kyslíku. To je zdánlivě v rozporu s mými výsledky. Vytváření ade pigmentu v dolní vrstvě kolonie až po jejím rozříznutí a po působení vzdušného kyslíku totiž ukazuje na nedostatek kyslíku v dolní vrstvě intaktních kolonií a je tedy pravděpodobné, že zde respirace neprobíhá. Důvodem, proč mají L buňky, na rozdíl od mých dolních buněk, pravděpodobně přístup ke kyslíku, je patrně rozdílné stáří kolonií. Peters *et al.* (1987) studovali bakteriální kolonie a popsali jejich spodní část jako hypoxickou. To se však týkalo pouze jednodenních kolonií. U starších kolonií (dvoudenních a starších) zaznamenali penetraci kyslíku do mnohem větší hloubky. Podobně v jednodenních kvasinkových koloniích je většina buněk metabolicky aktivních a spotřebovává velké množství kyslíku, který pak pravděpodobně neproniká do dolní vrstvy kolonie. (Bylo popsáno, že kvasinkové monokolonie prvních 42 hodin po zaočkování rostou exponenciálně; Meunier a Choder, 1999). Oproti tomu v sedmidenních a starších koloniích se vyskytuje více starších buněk, metabolická aktivita i spotřeba kyslíku je nižší a kyslík může pronikat hlouběji do kolonie a ovlivňovat dolní L buňky.

Zjistila jsem, že kmeny s delecí genu *ADE2* umožňují sledovat, které části kolonie jsou metabolicky aktivní a v jakých částech probíhá růst kolonie. Pigment nahromaděný ve vakuole totiž funguje jako stabilní značka, protože nemůže být úplně degradován. Ubývá ho pouze během pučení, kdy je jeho část společně s částí vakuoly předávána dceřiné buňce (Weisman *et al.*, 1987). Pokud sledujeme vývoj kolonie pomocí tenkých řezů několik dní za sebou, můžeme sledovat jak horní i dolní vrstva, které produkují ade pigment (anebo ho produkovaly v předchozích dnech), postupně přirůstají. Mezivrstva bez ade pigmentu, přestože se postupně vzdaluje od povrchu agarového média, tvoří stabilní hranici, je tvořena stále stejnými buňkami, protože není možné, aby souvislá vrstva buněk bez ade pigmentu vznikla z buněk s ade pigmentem. Z provedených experimentů vyplynulo, že během prvních dnů kultivace na YEPG médiu je růst výrazně rychlejší v dolní vrstvě než v horní vrstvě (data neuvedena).

Podařilo se mi zavést metodu pro detekci kyslíku a živin uvnitř kvasinkových kolonií a získat první zajímavé informace o horizontální diferenciaci kolonií *S. cerevisiae* na glukózovém živném médiu. V navazující práci bude třeba zjistit, zda a jak se tato velice časná diferenciaci (po 1 dni kultivace) liší od již dříve dobře popsané horizontální diferenciaci u starších kolonií (7 dní a více; Čáp *et al.*, 2012) rostoucích na glycerolovém živném médiu. Bude potřeba popsat



vlastnosti buněk horní a dolní vrstvy a porovnat je s buňkami U a L a porovnat produkci ade pigmentu (a tvorbu horizontálních vrstev) při kultivaci na glukózovém a glycerolovém médiu.

### 5.4.3 DETEKCE MĚDI VE VNĚJŠÍM PROSTŘEDÍ

---

Cílem této části mé práce bylo zjistit, zda je možné využít kmen s modifikovanou AMP drahou, konkrétně kmen *S. cerevisiae* BSCu, k detekci měďnatých iontů v životním prostředí. Tento kmen, který má deletován gen *ADE2* a před gen *ADE5,7* vložený promotor *CUP1*, červená v přítomnosti měďnatých iontů (viz kapitola 5.4.1). Protože indukce promotoru *CUP1* je závislá na koncentraci měďnatých iontů (Mascorro-Gallardo *et al.*, 1996), testovala jsem, zda je možné podle intenzity zbarvení buněk kmene BSCu přibližně určit koncentraci měďnatých iontů ve vnějším prostředí.

#### 5.4.3.1 Výběr vhodného způsobu kultivace a kultivačního média

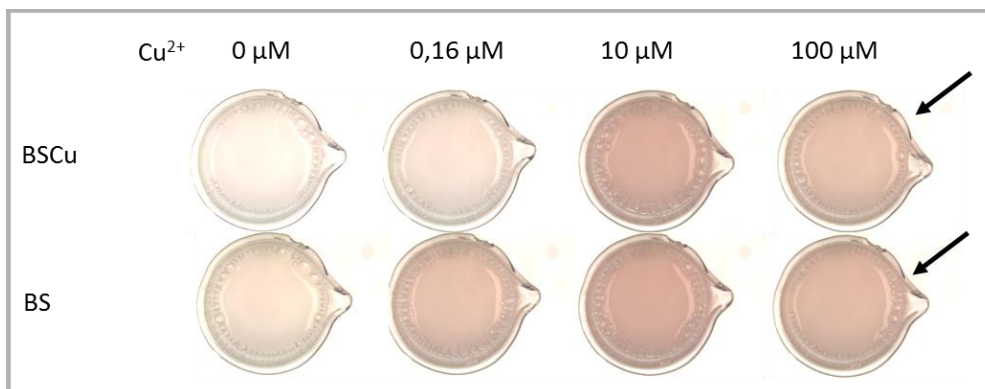
Nejprve jsem hledala takové podmínky kultivace, při kterých dojde k co nejsilnější produkci ade pigmentu a tedy k intenzivnímu červenému zbarvení kvasinkových buněk kmene BS ( $\Delta ade2$ ). Rovněž jsem sledovala, zda se za stejných podmínek kmen BSCu v přítomnosti  $Cu^{2+}$  iontů zbarví stejně intenzivně a zda v nepřítomnosti  $Cu^{2+}$  iontů ke zbarvení kmene BSCu nedojde.

Porovnávala jsem kultivace na pevných agarových médiích i tekuté kultivace, a to na různých živných médiích (komplexních i minimálních) s různým složením. Zjistila jsem, že k detekci není možné používat tekuté komplexní médium (YEPG), protože je málo definované a většinou obsahuje takové množství mědi, že kmen BSCu intenzivně zčervená. Rovněž není možné používat kultivace kolonií či nátěru na pevném médiu (ani komplexním ani minimálním), neboť opět dochází k zčervenání kmene BSCu i bez přídavku  $Cu^{2+}$  iontů.

Další experimenty jsem prováděla s definovaným tekutým SD médiem (bez měďnatých iontů). Protože používané kmeny nejsou kvůli deleci genu *ADE2* schopné syntetizovat adenin, musela jsem do SD média přidávat adeninsulfát. Jako optimální koncentraci jsem stanovila 4 mg adeninsulfátu na litr SD média. Při této koncentraci dochází k nejvýraznějšímu zbarvení obou kmenů. Při vyšší koncentraci je tvorba červeného pigmentu nižší díky zpětnovazební inhibici AMP dráhy koncovým produktem. Při nižší koncentraci adeninsulfátu je produkce červeného pigmentu pomalejší kvůli snížení růstové rychlosti kultury. Ve starších publikacích popisovaný (Dorfman, 1969) vliv koncentrace glukózy (2-8 %) na tvorbu ade pigmentu se při mých experimentech s SD médiem neprojevil.

#### 5.4.3.2 Detekce měďnatých iontů v tekuté kultuře *S. cerevisiae* BSCu

Kmeny BSCu a BS jsem kultivovala v tekutém SD médiu s 4mg adeninu na 1 litr (SD4ade médium) s přídavkem  $Cu^{2+}$  iontů o různých koncentracích (0 - 100  $\mu M$ ) v třepačce. Po 2 dnech kultivace jsem vyhodnotila zbarvení buněčné suspenze (obr. 5.34).



**Obr. 5.34.** Vliv koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  iontů na zbarvení buněčné suspenze kmenů *S. cerevisiae* BSCu a BS. Oba kmeny byly aerobně kultivovány 2 dny v SD médiu s přidavkem adeninsulfátu (SD4ade médium) a s přidavkem  $\text{Cu}^{2+}$  iontů o různých koncentracích (0 - 100  $\mu\text{M}$ ). Poté bylo vyfotografováno 10 ml buněčné suspenze v kádinkách o objemu 10 ml. Šipky označují vzorky, které se po 1 dni kultivace částečně odbarvily.

Buněčná suspenze kmene BSCu byla zbarvena tím více, čím vyšší byla koncentrace přidaných  $\text{Cu}^{2+}$  iontů. Výrazné zbarvení při koncentraci 100  $\mu\text{M}$  pozorované po 1 dni kultivace však bylo dočasné. Po dvou dnech kultivace bylo zbarvení stejného vzorku výrazně nižší. U kmene BS jsem očekávala stejné zbarvení ve všech variantách, tedy nezávislé na koncentraci přidaných  $\text{Cu}^{2+}$  iontů. Stejně jako u kmene BSCu však došlo k částečnému odbarvení suspenze při koncentraci 100  $\mu\text{M}$  (viz šipky na obrázku 5.34). Kromě toho u kmene BS došlo k nečekanému slabému zabarvení suspenze při nízké koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů (0  $\mu\text{M}$  a 0,16  $\mu\text{M}$ ).

I při dalších experimentech se potvrdilo, že při vysokých koncentracích  $\text{Cu}^{2+}$  iontů (50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ) dochází po delší době kultivace k částečnému odbarvení suspenze obou kmenů. K slabšímu probarvování suspenze kmene BS při nulovém nebo velmi malém přidavku  $\text{Cu}^{2+}$  iontů docházelo jen při některých experimentech.

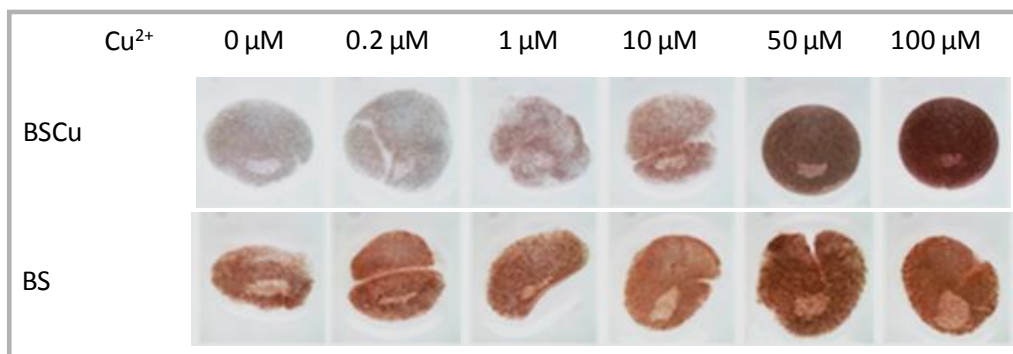
Zjistila jsem, že oba zmíněné nežádoucí jevy (odbarvování intenzivně zbarvených suspenzí při vysoké koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů a pomalé probarvování při nízké koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů) jsou eliminovány, pokud pro detekci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů použiji imobilizované kvasinky.

#### 5.4.3.3 Detekce měďnatých iontů - imobilizované kvasinky *S. cerevisiae* BSCu

Kvasinky kmene BSCu a kontrolního kmene BS jsem imobilizovala v alginátových kuličkách. Kvasinky v kuličkách jsem nechala pomnožit během 40hodinové kultivace v třepačce v tekutém médiu YEPG80ade. Použila jsem médium s vysokou koncentrací adeninsulfátu proto, aby nedošlo k nežádoucímu červenému zbarvení kultury. Předkultivované kuličky naplněné biomasou jsem skladovala v destilované vodě při teplotě 4 °C. Takto uskladněné kuličky je možno minimálně 50 následujících dní používat pro detekci mědi.

Při vlastní detekci jsem předkultivované kuličky BSCu a BS aerobně kultivovala v tekutém SD médiu bez adeninu s přidavkem  $\text{Cu}^{2+}$  iontů o různých koncentracích (0 - 100  $\mu\text{M}$ ). Díky absenci adeninu se kvasinkové buňky v kuličkách nemnožily. Po 18 hodinách kultivace jsem vyhodnotila zbarvení kuliček (obr. 5.35). V případě kuliček s kmenem BSCu odpovídala intenzita červeného zbarvení množství mědi v médiu. Čím vyšší byla koncentrace mědi, tím růžovější (až červené) byly kuličky. Kuličky s kmenem BS se zbarvily při různých koncentracích mědi přibližně stejně výrazně.





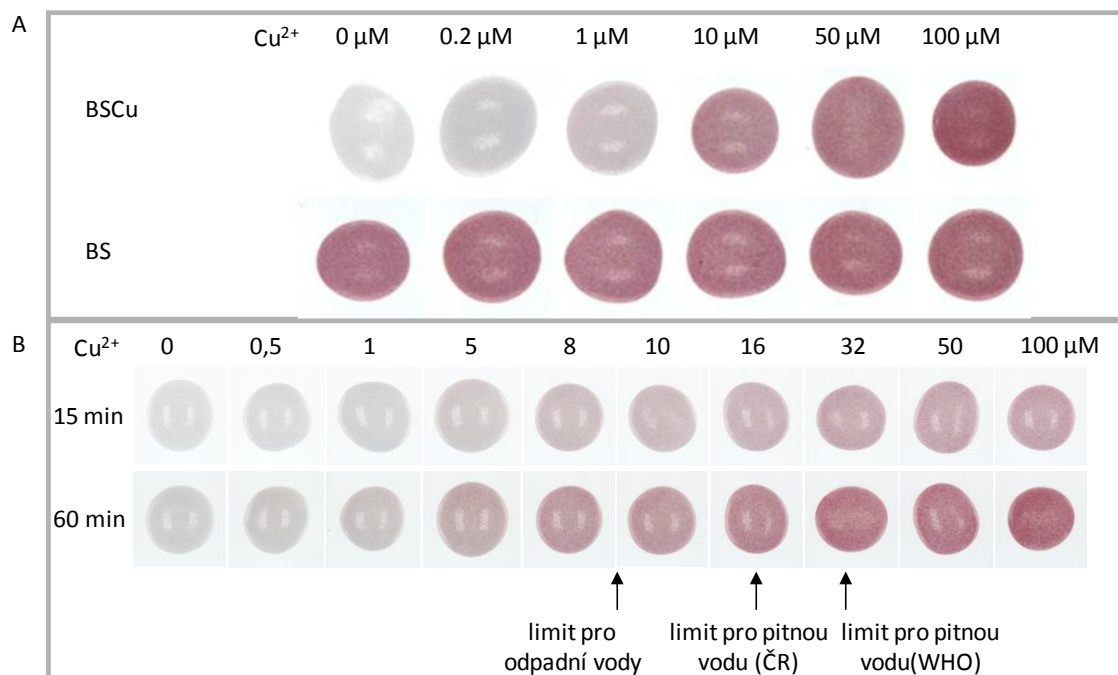
**Obr. 5.35.** Vliv koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  iontů na zbarvení buněk kmenů BSCu a BS imobilizovaných v alginátových kuličkách. Po předkultivaci v médiu YEPG80ade byly alginátové kuličky aerobně kultivovány 18 hodin v tekutém SD médiu bez adeninsulfátu a s přidavkem  $\text{Cu}^{2+}$  iontů o různých koncentracích (0 - 100  $\mu\text{M}$ ).

Na rozdíl od tekutých kultur, při použití imobilizovaných kmenů nedochází při vysokých koncentracích mědi k odbarvování buněk ani u jednoho z obou kmenů a nedochází ani ke slabšímu probarvování při nízkých koncentracích u kontrolního kmene BS. Důvodem je patrně skutečnost, že při použití alginátových kuliček se kultura namnoží během předkultivace v komplexním médiu a během vlastní detekce mědi se již buňky dále nemnoží (kvůli absenci adeninsulfátu v SD médiu). Kmen BSCu imobilizovaný v alginátových kuličkách tedy může být použit pro detekci mědi.

#### 5.4.3.4 Detekce měďnatých iontů - statická kultivace imobilizovaného kmene *S. cerevisiae* BSCu

Alginátové kuličky stejně jako buněčnou suspenzi jsem vždy kultivovala aerobně, protože podmínkou vzniku červeného ade pigmentu je oxidace intermediátu AIR (viz kapitola 5.4.1). Takto se buňky postupně probarvovaly a za 18 hodin bylo možné porovnat rozdíly ve zbarvení různých vzorků. Zjistila jsem však, že je výhodnější detekovat měďnaté ionty za anaerobních nebo téměř anaerobních podmínek a teprve dodatečně zajistit přístup kyslíku k buňkám.

Kuličky s imobilizovanými a předkultivovanými kmeny BSCu a BS jsem tedy kultivovala staticky v termostatu a opět v tekutém SD médiu bez adeninu s přidavkem  $\text{Cu}^{2+}$  iontů o různých koncentracích (0 - 100  $\mu\text{M}$ ). Díky absenci adeninu se kvasinkové buňky v kuličkách nemnožily a díky téměř anaerobnímu prostředí (na dně zkumavek s živným médiem) nedošlo k zbarvení kuliček. Všechny kuličky obou kmenů byly i po 19 hodinách bílé bez ohledu na koncentraci měďnatých iontů. Po skončení statické kultivace jsem kuličky přemístila z média na podložní sklíčko. Už po několika minutách na vzduchu začaly všechny kuličky kmene BS a kuličky kmene BSCu kultivované v přítomnosti vyšších koncentrací  $\text{Cu}^{2+}$  iontů měnit barvu. Po 30 minutách bylo možno u kmene BSCu pozorovat růst intenzity zbarvení v závislosti na koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů (od 0,5 do 100  $\mu\text{M}$ ). Po 1 h kultivace byly rozdíly v odstínech ještě nápadnější. Kontrolní kmen BS se vybarvoval intenzivně a nezávisle na koncentraci mědi (obr. 5.36A).



**Obr. 5.36.** Citlivost detekčního systému založeného na statické kultivaci kmenů imobilizovaných v alginátových kuličkách. A) Vliv koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  iontů (0 - 100  $\mu\text{M}$ ) na zbarvení buněk kmenů BSCu a BS. Po předkultivaci v YEPG80ade byly alginátové kuličky staticky kultivovány 19 hodin v tekutém SD médiu bez adeninsulfátu a potom inkubovány 1 hodinu za přítomnosti vzduchu. B) Kalibrační řada ukazuje zbarvení alginátových kuliček s kmenem BSCu. Kuličky byly 17 hodin staticky kultivovány v tekutém SD médiu bez adeninsulfátu a potom 15 nebo 60 minut inkubovány na vzduchu.

Z alginátových kuliček s detekčním kmenem BSCu, kultivovaných při různých koncentracích  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v SD médiu bez adeninu, jsem připravila podrobnou kalibrační řadu (obr. 5.36B), abych zjistila, zda je možné podle zbarvení kuliček rozpoznat koncentrace odpovídající limitním hodnotám požadovaným pro odpadní vody a pitnou vodu. Limitní hodnoty pro odpadní vodu jsou v ČR podle druhu odpadní vody 0,5 mg  $\text{Cu}^{2+}/\text{l}$  = 7,87  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  nebo 1 mg  $\text{Cu}^{2+}/\text{l}$  = 15,74  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ . Limitní hodnoty pro pitnou vodu jsou v ČR 1 mg  $\text{Cu}^{2+}/\text{l}$  = 15,74  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  a podle WHO 2 mg  $\text{Cu}^{2+}/\text{l}$  = 31,47  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ .

Ukázalo se, že pomocí imobilizovaného kmene BSCu je možné odhadnout přibližnou koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v testovaném vzorku, pokud zbarvení kuliček v testovaném vzorku porovnáme s vhodnou kalibrační řadou. Výhodou statické kultivace je, že vybarvení alginátových kuliček proběhne velmi rychle (během 5 - 60 minut) a až poté, co kuličky vyjmeme z živného média a vystavíme je působení vzduchu. Po kratší době na vzduchu lépe odlišíme zbarvení při vyšších koncentracích mědi (např. 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ). Po delší době na vzduchu lépe odlišíme zbarvení při nízkých koncentracích mědi (např. 0,5  $\mu\text{M}$  a 1  $\mu\text{M}$ ). Další výhodou statické kultivace je, že nedochází k rozpadání nepříliš odolných alginátových kuliček, jako při kultivaci s třepáním.

#### 5.4.3.5 Návod pro detekci $\text{Cu}^{2+}$ iontů pomocí imobilizovaného kmene BSCu

Kromě imobilizace v alginátu sodném jsem testovala rovněž imobilizaci v nosiči z polyvinylalkoholu (biokatalyzátor *lentikats*; patenty: Vorlop a Jekel, 1998 a Stloukal *et al.*, 2007). Výhodou biokatalyzátoru *lentikats* je vyšší odolnost a trvanlivost, je vhodnější pro průmyslové použití.

Vypracovala jsem 2 návody, jak detekovat  $\text{Cu}^{2+}$  ionty v tekutém testovaném vzorku pomocí již předkultivovaného biokatalyzátoru *lentikats*. Jedna varianta zahrnuje statickou kultivaci

detekčního kmene, druhá počítá s aerobní kultivací v třepačce. Stejně návody je možno použít pro kmeny imobilizované a překultivované v alginátových kuličkách.

#### **návod č. 1: Detekce zahrnující statickou kultivaci**

Detekce probíhá v uzavřených sterilních centrifugačních zkumavkách o objemu 15 ml s 5ml tekutého SD média bez adeninu. Kromě zkumavky s testovanou vodou je třeba připravit 3 kontrolní zkumavky (tab. 5.6):

- 1) kontrola č. 1 - SD médium připravené z deionizované vody
- 2) kontrola č. 2 - SD médium připravené z deionizované vody a s přidavkem  $\text{Cu}^{2+}$  iontů (např. 16  $\mu\text{M}$ )
- 3) kontrola č. 3 - SD médium připravené z vody, kterou testujeme, a s přidavkem  $\text{Cu}^{2+}$  iontů (např. 10  $\mu\text{M}$ )
- 4) SD médium připravené z vody, kterou testujeme na přítomnost  $\text{Cu}^{2+}$  iontů

	Kontrola č. 1	Kontrola č. 2	Kontrola č. 3	Vzorek č. 4	Vyhodnocení
	SD médium (demi $\text{H}_2\text{O}$ )	SD médium (demi $\text{H}_2\text{O}$ ) + $\text{Cu}^{2+}$	SD médium <b>testovaná voda</b> + $\text{Cu}^{2+}$	SD médium <b>testovaná voda</b>	
barva	bílá	červená	bílá	bílá	inhibice metabolismu; je potřeba snížit koncentraci testované vody v médiu
	bílá	červená	červená	bílá	testovaná voda neobsahuje $\text{Cu}^{2+}$
	bílá	červená	červená	červená	testovaná voda obsahuje $\text{Cu}^{2+}$
	bílá	červená	bílá	červená	testovaná voda obsahuje $\text{Cu}^{2+}$ *

**Tab. 5.6.** Možnosti zbarvení biokatalyzátoru s kmenem BSCu ve čtyřech zkumavkách potřebných k detekci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů a způsob vyhodnocení. (\*přidáním  $\text{Cu}^{2+}$  iontů u kontroly č. 3 bylo dosaženo kritické koncentrace, která již metabolismus kvasinek inhibuje)

Médium ve všech 4 zkumavkách musí mít přibližně stejné pH. Ideální je hodnota pH 4,5-6,0, kdy dochází k nejlepšímu probarvování biokatalyzátoru *lentikats*. Do každé ze 4 zkumavek vložíme stejné množství (1-6 kusů) biokatalyzátoru a uzavřeme. Inkubujeme minimálně 17 hodin v termostatu při 28-30 °C. Zkumavky umístíme naležato do třepačky a inkubujeme 10 minut při 28-30 °C (rpm 120, třepačka NB-205 N-BIOTEK). Tento krok nahrazuje prosté vyndání biokatalyzátoru z média a umožní (společně s dalšími modifikacemi) využít tuto metodu i v prostředí, kde není možné pracovat s geneticky manipulovanými organismy mimo uzavřený systém.

Po skončení inkubace vyhodnotíme zbarvení biokatalyzátoru ve zkumavkách a určíme, zda testovaná voda obsahuje  $\text{Cu}^{2+}$  (tab. 5.6). Kontrola č. 1 musí být bílá, červené zbarvení by znamenalo kontaminaci SD média mědí. Kontrola č. 2 musí být červená, bílé zbarvení by znamenalo, že kvasinky v biokatalyzátoru nejsou aktivní. Kontrola č. 3 musí být červená. Pokud testovaná voda obsahuje  $\text{Cu}^{2+}$  ionty, vzorek č. 4 je červený. Koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  v testované vodě můžeme odhadnout porovnáním intenzity zbarvení vzorku č. 4 se zbarvením kontroly č. 3, u které je koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  známá. Pro přesnější odhad koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  v testované vodě můžeme použít více variant kontroly č. 3 (s různými koncentracemi přidaného  $\text{Cu}^{2+}$ ). Pokud je

vzorek č. 4 bílý, testovaná voda neobsahuje  $\text{Cu}^{2+}$  ionty anebo obsahuje jejich velmi nízkou koncentraci (méně než  $1 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ).

Bílé zbarvení kontroly č. 3 většinou znamená, že testovaná voda obsahuje příliš vysokou koncentraci mědi či jiných škodlivin, která inhibuje metabolickou aktivitu kvasinek. Díky tomu je bílé zbarvený i vzorek č. 4. V tomto případě je třeba testovanou vodu naředit a celý proces detekce zopakovat. Méně pravděpodobná ale také možná je varianta, kdy je kontrola č. 3 zbarvena bíle a vzorek č. 4 zbarven červeně. Tato situace může nastat, pokud přidání  $\text{Cu}^{2+}$  do kontroly č. 3 způsobí zvýšení koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  iontů nad kritickou hodnotu, která již metabolismus kvasinek inhibuje. V tomto případě koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v testované vodě odhadnout můžeme.

## **návod č. 2: Rychlejší varianta s aerobní kultivací**

Detekce probíhá v uzavřených sterilních centrifugačních zkumavkách o objemu 15 ml s 2-3 ml tekutého SD média. I při této variantě je potřeba kromě zkumavky s testovanou vodou připravit 3 kontrolní zkumavky (tab. 5.6) a pH živných médií ve všech zkumavkách upravit na přibližně stejnou hodnotu (nejlépe 4,5-6,0). Do každé zkumavky umístíme stejné množství (1-2 kusy) biokatalyzátoru a uzavřeme. Zkumavky umístíme naležato do třepačky a inkubujeme minimálně 8,5 hodin při 28-30 °C (rpm 120, třepačka NB-205 N-BIOTEK). Po skončení inkubace vyhodnotíme zbarvení biokatalyzátoru ve zkumavkách a určíme, zda testovaná voda obsahuje  $\text{Cu}^{2+}$  (tab. 5.6).

Spolehlivost detekce  $\text{Cu}^{2+}$  iontů pomocí kmene BSCu jsem vyzkoušela na reálných vzorcích. Pomocí kmene imobilizovaného v alginátových kuličkách jsem detekovala měďnaté ionty uvolněné do pitné vody z měděných trubek a v dalším experimentu měďnaté ionty uvolněné do vody ohřáté v průtokovém ohříváči s měděnou spirálou (data neuvedena). Výsledky druhého pokusu jsem nechala ověřit v laboratoři VIS-Praha. Hodnoty naměřené certifikovanou laboratoří metodou AAS byly podle očekávání mírně vyšší než hodnoty získané pomocí kmene BSCu. Zatímco kmen BSCu detekuje pouze měďnaté ionty ze sloučenin rozpustných ve vodě, metoda AAS detekuje i měď obsaženou v nerozpustných sloučeninách.

### **5.4.3.6 Diskuze**

Vyvinuli jsme nový způsob detekce měďnatých iontů pomocí kmene *S. cerevisiae* BSCu s modifikovanou AMP drahou pro biosyntézu purinů. Tento kmen má deletovaný gen *ADE2* a před genem *ADE5,7* má umístěný promotor *CUP1*, který je indukovatelný  $\text{Cu}^{2+}$  ionty (Macreadie *et al.*, 1991). Kmen BSCu v přítomnosti měďnatých iontů zčervená; je schopen detekovat  $\text{Cu}^{2+}$  ionty v rozmezí koncentrací 1 – 100  $\mu\text{M}$ . Systém umožňuje přibližný odhad koncentrace měďnatých iontů, pokud je detekce prováděna paralelně s kalibrací intenzity zbarvení na vzorcích o známé koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$ . Podobný způsob detekce těžkých kovů zatím nebyl v odborné literatuře popsán.

Běžné analytické metody pro stanovení mědi a dalších těžkých kovů (např. AAS, ICP-OES, ICP-MS) jsou časově a finančně náročné a vyžadují vysoce kvalifikovaný personál. Velice spolehlivě měří celkovou koncentraci kovových iontů (včetně nerozpustných forem těžkých kovů), neposkytují však žádnou informaci o koncentraci kovů schopných interagovat s biologickou molekulou nebo živým organismem. Tuto vlastnost mají biosenzory, které obsahují citlivý prvek biologického původu (např. enzym, neenzymový protein, DNA, celé buňky) a nějaký fyzikálně-chemický převodník (Rechnitz, 1991). Biosenzory umožňují rychlé, citlivé a specifické stanovení látek.

Některé biosenzory založené na celých buňkách využívají inhibiční efekt těžkých kovů na buněčné procesy. Jako součást biosenzoru pro detekci těžkých kovů byla použita například luminiscenční bakterie *Photobacterium phosphoreum*. Podstatou detekce je snížení intenzity luminiscence v přítomnosti toxických molekul včetně chromu  $\text{Cr}^{\text{VI}}$ . Stanovení je založeno na měření intenzity světla emitovaného bakteriemi.  $I_{50}$  bylo dosaženo při koncentraci 0,85 nM  $\text{Cr}^{6+}$  (Lee *et al.*, 1992). Tekaya *et al.* (2013) připravili konduktometrický biosenzor měřící aktivitu alkalické fosfatázy (APA) sinice *Arthrospira platensis* (Spirulina). V přítomnosti těžkých kovů byla aktivita APA inhibována.  $I_{50}$  bylo dosaženo při koncentraci  $10^{-19}$  mol.l<sup>-1</sup> pro kadmium a  $10^{-17}$  mol.l<sup>-1</sup> pro rtuť.

Další skupina biosenzorů využívá schopnosti kvasinkové biomasy adsorbovat těžké kovy z vodného roztoku. Například lyofilizovaná biomasa kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* byla použita pro konstrukci voltametrického biosenzoru s detekčním limitem pro ionty  $\text{Cu}^{2+}$   $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M (Yüce *et al.*, 2010). Detekční limit voltametrického biosenzoru využívajícího neživou biomasu řasy *Tetraselmis chuii* je pro  $\text{Cu}^{2+}$   $4,6 \cdot 10^{-10}$  M (Alpat *et al.*, 2007).

Široké uplatnění mají biosenzory založené na geneticky modifikovaných organizmech, u kterých promotor indukovaný těžkými kovy kontroluje produkci reportérového proteinu. Například Corbisier *et al.* (1999) použili bakterii *Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonia metallidurans*) a reportérový operon *luxCDABE* (z bakterie *Vibrio fischeri*). Jako promotor použili oblasti promotoru  $\sigma_{54}$  indukovatelné těžkými kovy. Tento biosenzor zvyšuje luminiscenci v přítomnosti těžkých kovů. Nejnižší detekovaná koncentrace byla 1,0  $\mu\text{M}$  pro  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cr}^{6+}$  a 0,5  $\mu\text{M}$  pro  $\text{Pb}^{2+}$ . Podobný bioluminiscenční biosenzor založený na *Alcaligenes eutrophus* a reportérovém operonu *luxCDABE* popsali rovněž Leth *et al.* (2002). Systém zdokonalili použitím optického vlákna a nejnižší detekovatelná koncentrace měďnatých iontů byla 1  $\mu\text{M}$ .

Lehmann *et al.* (2000) vyvinuli ampérometrický biosenzor využívající rekombinantní kvasinku *S. cerevisiae* s plazmidy s *lacZ* genem (z *E. coli*) regulovaným promotorem *CUP1* (ze *S. cerevisiae*), který je indukovatelný měďí nebo ionty stříbra. Přítomnost mědi v médiu umožňuje kvasince využívat laktózu jako zdroj uhlíku, což vede ke změně spotřeby kyslíku v buňce. Senzor detekuje  $\text{Cu}^{2+}$  v rozmezí 0,5-2 mM  $\text{CuSO}_4$ .

Měďí indukovatelný *CUP1* promotor použili pro konstrukci biosenzoru rovněž Shetty *et al.* (2004). Do kvasinky *S. cerevisiae* vnesli plazmid s genem pro GFP pod kontrolou promotoru *CUP1*. V přítomnosti měďnatých iontů dochází k aktivaci promotoru *CUP1* a k produkci GFP. Množství produkovaného GFP bylo monitorováno prostřednictvím jeho fluorescence. Systém je schopen detekovat  $\text{Cu}^{2+}$  ionty již od koncentrace 0,5  $\mu\text{M}$ .

V naší laboratoři vyvinutý senzor je založený na celých buňkách *S. cerevisiae* BSCu a má tedy výše popsané výhody buněčných senzorů. Jeho hlavní předností však je, že nepotřebuje žádný fyzikálně-chemický převodník. Kvasinkové buňky mění barvu z bílé na červenou a detekce je pouze vizuální. Senzor umožňuje přibližné stanovení koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  iontů na základě srovnání zbarvení neznámého vzorku s paralelně připraveným vzorkem obsahujícím známou koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů.

Jediný dosud popsaný senzor bez převodníku využívající celé buňky a vizuální detekci popisuje Yoshida *et al.* (2008). Tento senzor využívá červenou bakterii *Rhodospseudomonas palustris* k detekci arsenu. Vlastní detekce se výrazně odlišuje od našeho detekčního systému. Senzor podle Yoshidy využívá kmen *R. palustris* s delecí genu *crtI*, který netvoří  $\beta$ -karoten a má proto modrozelené zbarvení. Tento kmen nese plazmid s genem *crtI* umístěným za promotorem Pars. V přítomnosti arsenu dochází k obnovení exprese genu *crtI* a buňky se zbarví červeně.

Námi připravený senzor se neomezuje na detekci jediné chemické látky. Měďnatými ionty indukovatelný promotor *CUP1* regulující expresi genu *ADE5,7* může být nahrazen jiným

promotorem, které je specificky indukovatelný jinou látkou. Již jsem vyzkoušela promotor *GAL1* umožňující detekovat přítomnost galaktózy. Další výhodou našeho senzoru je jeho stabilita daná tím, že modifikace kmene spočívá ve změně genomu (nejedná se o modifikaci plazmidu).

Detekce pomocí kmene BSCu vyžaduje použití imobilizovaných kvasinek. Vyzkoušela jsem 2 různé způsoby imobilizace (alginátové kuličky a biokatalyzátor *lentikats*; Vorlop a Jekel, 1998 a Stloukal *et al.*, 2007) a ověřila, že oba způsoby je možné použít pro detekci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů. Imobilizace přináší mnoho výhod. Kvasinkové buňky jsou přítomny v kuličkách (či biokatalyzátoru *lentikats*) v dostatečném množství už před započítáním detekce. Během vlastní detekce se již nemnoží, pouze metabolizují. Proto detekce pomocí imobilizovaných kvasinek vyžaduje mnohem kratší dobu (8,5 hodiny nebo v případě statické kultivace 17 hodin) než detekce pomocí buněčné suspenze (2 dny). Další výhodou použití nemnožící se kultury, je skutečnost, že nerostoucí kultura nerozrušuje alginátové kuličky. Alginát není příliš pevný a tlak dělících se buněk kuličky poškozuje. Ještě šetrnější způsob kultivace je statická kultivace bez třepání.

Díky použití nosiče jsou kvasinkové buňky soustředěny ve velkém množství v malém objemu nosiče. Případné zbarvení je proto velmi intenzivní, mnohem výraznější než u buněk rozptýlených v buněčné suspenzi. Další výhody jsou zřejmé: snadná manipulace s kvasinkovou kulturou, snadné skladování, menší problémy s kontaminací.

Samozřejmě zásadní výhodou je skutečnost, že při kultivaci v kuličkách či biokatalyzátoru *lentikats* nedochází u kontrolního kmene BS (neobsahuje promotor *CUP1*) k nedostatečnému probarvování při velmi nízkých koncentracích  $\text{Cu}^{2+}$  a nedochází ani k odbarvování buněk kontrolního (BS) i detekčního (BSCu) kmene při vysokých koncentracích  $\text{Cu}^{2+}$  iontů. K slabému probarvování rostoucí neimobilizované suspenze kmene BS při nulovém nebo velmi malém přídávku  $\text{Cu}^{2+}$  iontů docházelo pouze při některých experimentech. Protože  $\text{Cu}^{2+}$  ionty jsou pro některé buněčné procesy ve stopovém množství nepostradatelné, je možné, že jejich nulová nebo velmi nízká koncentrace nepříznivě ovlivnila proliferaci buněk a jejich metabolismus, a tím i zbarvování buněk. Detekce pomocí imobilizované nemnožící se kultury tento problém odstranila.

Důvod, proč se rostoucí neimobilizované suspenze kmenů BS a BSCu při vysokých koncentracích  $\text{Cu}^{2+}$  iontů na rozdíl od imobilizovaných buněk částečně odbarvují, není jasný. Je možné, že třepané množící se kultury červený ade pigment úspěšněji odbourávají. Je známo, že se metabolismus tekutých a imobilizovaných kultur v mnoha ohledech liší (viz přehledový článek Norton a D'Amore, 1994).

Nově vyvinutý detekční kmen může být použit pro detekci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů. Je schopen spolehlivě zachytit překročení limitních hodnot pro pitnou vodu ( $1 \text{ mg Cu}^{2+}/\text{l} = 15,74 \text{ }\mu\text{M Cu}^{2+}$ ) i průmyslové odpadní vody (podle odvětví  $0,5 \text{ mg Cu}^{2+}/\text{l} = 7,87 \text{ }\mu\text{M Cu}^{2+}$  nebo  $1 \text{ mg Cu}^{2+}/\text{l} = 15,74 \text{ }\mu\text{M Cu}^{2+}$ ).

Výsledky práce jsou prezentovány v publikaci (**Vopálenská et al., 2015**). Způsob modifikace detekčního kvasinkového kmene je předmětem přijatého patentu (**Vopálenská et al., 2015**). Byla vypracována certifikovaná metodika, která popisuje konkrétní set pro detekci měďnatých iontů v pitných a průmyslových odpadních vodách a jeho použití, přičemž je zajištěno, aby celý proces probíhal v uzavřeném systému a aby byl biologický materiál správně zlikvidován (**Stloukal et al., 2014**):

**Publikace:**

Vopálenská I., Váchová L., Palková Z.: New biosensor for detection of copper ions in water based on immobilized genetically modified yeast cells. *Biosens Bioelectron* 2015 May 6; 72: 160-167. IF<sup>2013</sup>: 6,451

**Patent:**

Vopálenská I., Palková Z., Váchová L.: Způsob modifikace detekčního kvasinkového kmene. CZ 305223, patent. Praha (2015). (majitelem je Univerzita Karlova v Praze a Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., datum zápisu 6. 5. 2015)

**Certifikované metodika:**

Stloukal R., Vopálenská I., Watzková J., Gregušová B., Palková Z., Váchová L., Pichová I.: Uplatněná certifikovaná metodika: Metodika užití jednorázového setu pro detekci měďnatých ( $\text{Cu}^{2+}$ ) iontů v pitných a průmyslových odpadních vodách, 2014, s. 24.

## 6 ZÁVĚR

---

Tato práce se zabývá vlivem různých faktorů na morfologii a diferenciaci kolonií kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Přináší také nové přístupy pro studium diferenciaci a přítomnosti živin uvnitř kolonií a rovněž metodu využívající imobilizované kvasinkové populace pro stanovení přítomnosti měďnatých iontů ve vodných roztocích. Nejdůležitější výsledky, které práce přináší, jsou shrnuty v následujících bodech.

1. Zjistila jsem, že se typ pučení v kvasinkových koloniích liší od typu pučení v tekutém médiu a ovlivňuje morfologii kolonií.
2. Zjistila jsem, že tvorba vysoce strukturovaných kolonií kmenů *S. cerevisiae* odvozených od kmene  $\Sigma 1278b$  je závislá na schopnosti buněk tvořit buněčné klastry a agregáty, přičemž hraje významnou roli dimorfní přeměna z kvasinkových buněk na pseudohyfální. Popsala jsem dvě odlišně regulované dimorfní přeměny probíhající v různých fázích vývoje kolonií: první probíhá na počátku vývoje kolonií a vede ke kolonizaci živného média; druhá je nezbytná pro pozdější vznik výrazně strukturované morfologie. Společně s kolegy jsme prokázali úlohu flokulinu Flo11p při druhé dimorfní přeměně.
3. Našla jsem vhodné podmínky pro účinnou indukci alkalické fáze u *S. cerevisiae* BY4742 pomocí metylaminu a amoniaku a popsala, jakým způsobem tyto látky ovlivňují morfologii a diferenciaci kolonií. Popsala jsem také vliv těchto látek na produkci fúzního proteinu Ato1p-GFP.
4. Zavedla jsem novou všestranně použitelnou metodu pro detekci živin a kyslíku pomocí kvasinkových kmenů s modifikacemi dráhy biosyntézy purinů (např. delece genu *ADE2* v kombinaci s vložením indukovatelného promotoru před gen *ADE5,7*).
5. Nově vyvinutou metodu jsem využila pro monitorování přítomnosti kyslíku, adeninu a galaktózy v koloniích *S. cerevisiae*. Odhalila jsem diferenciaci kolonie na tři horizontální vrstvy s odlišnými vlastnostmi.
6. Vypracovala jsem postup, který umožňuje detekovat měďnaté ionty v tekutých vzorcích a přibližně stanovit koncentraci těchto iontů v rozmezí 1 - 100  $\mu\text{M}$ . Metodu jsem vyzkoušela na reálných vzorcích a ověřila její spolehlivost.



## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

---

- Alpat, S., K., Alpat, S., Kutlu B., Özbayrak, Ö., Büyüksık H.B. (2007). Development of biosorption-based algal biosensor for Cu(II) of *Tetraselmis chuii* Sensors and Actuators B 128, 273-278.
- Aun, A., Tamm, T., and Sedman, J. (2013). Dysfunctional mitochondria modulate cAMP-PKA signaling and filamentous and invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 193, 467-481.
- Bao, M.Z., Schwartz, M.A., Cantin, G.T., Yates, J.R., 3rd, and Madhani, H.D. (2004). Pheromone-dependent destruction of the Tec1 transcription factor is required for MAP kinase signaling specificity in yeast. Cell 119, 991-1000.
- Barrales, R.R., Jimenez, J., and Ibeas, J.I. (2008). Identification of novel activation mechanisms for FLO11 regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 178, 145-156.
- Bayly, J.C., Douglas, L.M., Pretorius, I.S., Bauer, F.F., and Dranginis, A.M. (2005). Characteristics of Flo11-dependent flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS yeast research 5, 1151-1156.
- Berman, J. (2006). Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. Current opinion in microbiology 9, 595-601.
- Bester, M.C., Jacobson, D., and Bauer, F.F. (2012). Many *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein encoding genes are coregulated by Mss11, but cellular adhesion phenotypes appear only Flo protein dependent. G3 (Bethesda) 2, 131-141.
- Bester, M.C., Pretorius, I.S., and Bauer, F.F. (2006). The regulation of *Saccharomyces cerevisiae* FLO gene expression and Ca<sup>2+</sup> -dependent flocculation by Flo8p and Mss11p. Current genetics 49, 375-383.
- Bi, E., and Park, H.O. (2012). Cell polarization and cytokinesis in budding yeast. Genetics 191, 347-387.
- Boeckstaens, M., Andre, B., and Marini, A.M. (2007). The yeast ammonium transport protein Mep2 and its positive regulator, the Npr1 kinase, play an important role in normal and pseudohyphal growth on various nitrogen media through retrieval of excreted ammonium. Molecular microbiology 64, 534-546.
- Bogonez, E., Machado, A., and Satrustegui, J. (1983). Ammonia accumulation in acetate-growing yeast. Biochimica et biophysica acta 733, 234-241.
- Borneman, A.R., Leigh-Bell, J.A., Yu, H., Bertone, P., Gerstein, M., and Snyder, M. (2006). Target hub proteins serve as master regulators of development in yeast. Genes & development 20, 435-448.
- Braus, G.H., Grundmann, O., Bruckner, S., and Mosch, H.U. (2003). Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and FLO11 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular biology of the cell 14, 4272-4284.
- Broach, J.R. (2012). Nutritional control of growth and development in yeast. Genetics 192, 73-105.
- Bruckner, S., and Mosch, H.U. (2012). Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS microbiology reviews 36, 25-58.

- Bumgarner, S.L., Dowell, R.D., Grisafi, P., Gifford, D.K., and Fink, G.R. (2009). Toggle involving cis-interfering noncoding RNAs controls variegated gene expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 18321-18326.
- Byrne, K.P., and Wolfe, K.H. (2005). The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome research* 15, 1456-1461.
- Cap, M., Stepanek, L., Harant, K., Vachova, L., and Palkova, Z. (2012). Cell differentiation within a yeast colony: metabolic and regulatory parallels with a tumor-affected organism. *Molecular cell* 46, 436-448.
- Casalone, E., Barberio, C., Cappellini, L., and Polsinelli, M. (2005). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* natural populations for pseudohyphal growth and colony morphology. *Research in microbiology* 156, 191-200.
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H.N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Texeira, M., and Thevelein, J.M. (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews* 38, 254-299.
- Cook, J.G., Bardwell, L., and Thorner, J. (1997). Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* 390, 85-88.
- Corbisier P.; Lelie, D.B., Provoost, A, Lorenzo, V., Brown, N.L., Lloyd, J.R., Hobman, J.L., Csöregi, E., Johansson, G., Mattiasson B. (1999). Whole cell-and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples. *Anal Chim Acta* 387, 235-244.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annual review of microbiology* 49, 711-745.
- Cote, J., Quinn, J., Workman, J.L., and Peterson, C.L. (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* 265, 53-60.
- Crespi, B.J. (2001). The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends in ecology & evolution* 16, 178-183.
- Crespo, J.L., Powers, T., Fowler, B., and Hall, M.N. (2002). The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 6784-6789.
- Cullen, P.J., Sabbagh, W., Jr., Graham, E., Irick, M.M., van Olden, E.K., Neal, C., Delrow, J., Bardwell, L., and Sprague, G.F., Jr. (2004). A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes & development* 18, 1695-1708.
- Cullen, P.J., and Sprague, G.F., Jr. (2000). Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13619-13624.
- Cullen, P.J., and Sprague, G.F., Jr. (2002). The roles of bud-site-selection proteins during haploid invasive growth in yeast. *Molecular biology of the cell* 13, 2990-3004.
- Cullen, P.J., and Sprague, G.F., Jr. (2012). The regulation of filamentous growth in yeast. *Genetics* 190, 23-49.
- Cutler, N.S., Pan, X., Heitman, J., and Cardenas, M.E. (2001). The TOR signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients. *Molecular biology of the cell* 12, 4103-4113.

- Davies, L., Satre, M., Martin, J.B., and Gross, J.D. (1993). The target of ammonia action in dictyostelium. *Cell* 75, 321-327.
- Dickinson, J.R. (1994). Irreversible formation of pseudohyphae by haploid *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology letters* 119, 99-103.
- Dickinson, J.R. (1996). 'Fusel' alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeasts. *Microbiology* 142 ( Pt 6), 1391-1397.
- Donlan, R.M., and Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews* 15, 167-193.
- Dorfman, B.Z. (1969). The isolation of adenylosuccinate synthetase mutants in yeast by selection for constitutive behavior in pigmented strains. *Genetics* 61, 377-389.
- Dowell, R.D., Ryan, O., Jansen, A., Cheung, D., Agarwala, S., Danford, T., Bernstein, D.A., Rolfe, P.A., Heisler, L.E., Chin, B., *et al.* (2010). Genotype to phenotype: a complex problem. *Science* 328, 469.
- Dranginis, A.M., Rauceo, J.M., Coronado, J.E., and Lipke, P.N. (2007). A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 71, 282-294.
- Estruch, F., and Carlson, M. (1990). Increased dosage of the MSN1 gene restores invertase expression in yeast mutants defective in the SNF1 protein kinase. *Nucleic acids research* 18, 6959-6964.
- Freese, E.B., Chu, M.I., and Freese, E. (1982). Initiation of yeast sporulation of partial carbon, nitrogen, or phosphate deprivation. *Journal of bacteriology* 149, 840-851.
- Gagiano, M., Bauer, F.F., and Pretorius, I.S. (2002). The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* 2, 433-470.
- Gagiano, M., van Dyk, D., Bauer, F.F., Lambrechts, M.G., and Pretorius, I.S. (1999). Msn1p/Mss10p, Mss11p and Muc1p/Flo11p are part of a signal transduction pathway downstream of Mep2p regulating invasive growth and pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* 31, 103-116.
- Galitski, T., Saldanha, A.J., Styles, C.A., Lander, E.S., and Fink, G.R. (1999). Ploidy regulation of gene expression. *Science* 285, 251-254.
- Gatto, P., Vrhovsek, U., Muth, J., Segala, C., Romualdi, C., Fontana, P., Pruefer, D., Stefanini, M., Moser, C., Mattivi, F., *et al.* (2008). Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 11773-11785.
- Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in enzymology* 350, 87-96.
- Jimeno, C.J., and Fink, G.R. (1994). Induction of pseudohyphal growth by overexpression of PHD1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Molecular and cellular biology* 14, 2100-2112.
- Jimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68, 1077-1090.
- Granek, J.A., and Magwene, P.M. (2010). Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. *PLoS genetics* 6, e1000823.

- Gross, J.D. (1994). Developmental decisions in *Dictyostelium discoideum*. *Microbiological reviews* 58, 330-351.
- Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G.J., Voss, D., and Hegemann, J.H. (2002). A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic acids research* 30, e23.
- Guilliermond, A. (1920). *The Yeasts*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Guldener, U., Koehler, G.J., Haussmann, C., Bacher, A., Kricke, J., Becher, D., and Hegemann, J.H. (2004). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Fol1 protein: starvation for C1 carrier induces pseudohyphal growth. *Molecular biology of the cell* 15, 3811-3828.
- Guo, B., Styles, C.A., Feng, Q., and Fink, G.R. (2000). A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12158-12163.
- Halme, A., Bumgarner, S., Styles, C., and Fink, G.R. (2004). Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* 116, 405-415.
- Harashima, T., Anderson, S., Yates, J.R., 3rd, and Heitman, J. (2006). The kelch proteins Gpb1 and Gpb2 inhibit Ras activity via association with the yeast RasGAP neurofibromin homologs Ira1 and Ira2. *Molecular cell* 22, 819-830.
- Hicks, J.B., Strathern, J.N., and Herskowitz, I. (1977). Interconversion of Yeast Mating Types III. Action of the Homothallism (HO) Gene in Cells Homozygous for the Mating Type Locus. *Genetics* 85, 395-405.
- Chant, J. (1996). Generation of cell polarity in yeast. *Current opinion in cell biology* 8, 557-565.
- Chant, J., and Herskowitz, I. (1991). Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway. *Cell* 65, 1203-1212.
- Chant, J., and Pringle, J.R. (1995). Patterns of bud-site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* 129, 751-765.
- Chavel, C.A., Dionne, H.M., Birkaya, B., Joshi, J., and Cullen, P.J. (2010). Multiple signals converge on a differentiation MAPK pathway. *PLoS genetics* 6, e1000883.
- Chen, H., and Fink, G.R. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & development* 20, 1150-1161.
- Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J., and Fink, G.R. (2004). Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 5048-5052.
- Chen, R.E., and Thorner, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 1311-1340.
- Chen, R.E., and Thorner, J. (2010). Systematic epistasis analysis of the contributions of protein kinase A- and mitogen-activated protein kinase-dependent signaling to nutrient limitation-evoked responses in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 185, 855-870.
- Cherkasova, V.A., McCully, R., Wang, Y., Hinnebusch, A., and Elion, E.A. (2003). A novel functional link between MAP kinase cascades and the Ras/cAMP pathway that regulates survival. *Current biology : CB* 13, 1220-1226.
- Chin, B.L., Ryan, O., Lewitter, F., Boone, C., and Fink, G.R. (2012). Genetic variation in *Saccharomyces cerevisiae*: circuit diversification in a signal transduction network. *Genetics* 192, 1523-1532.

- Ishigami, M., Nakagawa, Y., Hayakawa, M., and Imura, Y. (2006). FLO11 is the primary factor in floer formation caused by cell surface hydrophobicity in wild-type floer yeast. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 70, 660-666.
- Jackson, C.L., and Hartwell, L.H. (1990). Courtship in *S. cerevisiae*: both cell types choose mating partners by responding to the strongest pheromone signal. *Cell* 63, 1039-1051.
- Jakimowicz, D., and van Wezel, G.P. (2012). Cell division and DNA segregation in *Streptomyces*: how to build a septum in the middle of nowhere? *Molecular microbiology* 85, 393-404.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., *et al.* (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21, 947-962.
- Jesch, S.A., Zhao, X., Wells, M.T., and Henry, S.A. (2005). Genome-wide analysis reveals inositol, not choline, as the major effector of Ino2p-Ino4p and unfolded protein response target gene expression in yeast. *The Journal of biological chemistry* 280, 9106-9118.
- Jin, R., Dobry, C.J., McCown, P.J., and Kumar, A. (2008). Large-scale analysis of yeast filamentous growth by systematic gene disruption and overexpression. *Molecular biology of the cell* 19, 284-296.
- Jiranek, V., Graves, J.A., and Henry, S.A. (1998). Pleiotropic effects of the *opi1* regulatory mutation of yeast: its effects on growth and on phospholipid and inositol metabolism. *Microbiology* 144 ( Pt 10), 2739-2748.
- Kamath, R.S., and Bungay, H.R. (1988). Growth of yeast colonies on solid media. *Journal of general microbiology* 134, 3061-3069.
- Karunanithi, S., and Cullen, P.J. (2012). The filamentous growth MAPK Pathway Responds to Glucose Starvation Through the Mig1/2 transcriptional repressors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 192, 869-887.
- Karunanithi, S., Vadaie, N., Chavel, C.A., Birkaya, B., Joshi, J., Grell, L., and Cullen, P.J. (2010). Shedding of the mucin-like flocculin Flo11p reveals a new aspect of fungal adhesion regulation. *Current biology : CB* 20, 1389-1395.
- Kataoka, T., Powers, S., McGill, C., Fasano, O., Strathern, J., Broach, J., and Wigler, M. (1984). Genetic analysis of yeast RAS1 and RAS2 genes. *Cell* 37, 437-445.
- Kato, M., Hayakawa, Y., Hyodo, H., Ikoma, Y., and Yano, M. (2000). Wound-induced ethylene synthesis and expression and formation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase, ACC oxidase, phenylalanine ammonia-lyase, and peroxidase in wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Plant & cell physiology* 41, 440-447.
- Kim, H.Y., Lee, S.B., Kang, H.S., Oh, G.T., and Kim, T. (2014). Two distinct domains of Flo8 activator mediates its role in transcriptional activation and the physical interaction with Mss11. *Biochemical and biophysical research communications* 449, 202-207.
- Klasson, H., Fink, G.R., and Ljungdahl, P.O. (1999). Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Molecular and cellular biology* 19, 5405-5416.
- Kobayashi, O., Hayashi, N., Kuroki, R., and Sone, H. (1998). Region of FLO1 proteins responsible for sugar recognition. *Journal of bacteriology* 180, 6503-6510.
- Kobayashi, O., Yoshimoto, H., and Sone, H. (1999). Analysis of the genes activated by the FLO8 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* 36, 256-261.

- Kocková-Kratochvílová, A. (1982). Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. S. 36, 49. ALFA, Bratislava.
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A.W., Donaton, M.C., Van Dijck, P., Winderickx, J., de Winde, J.H., and Thevelein, J.M. (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Molecular microbiology* 32, 1002-1012.
- Krisak, L., Strich, R., Winters, R.S., Hall, J.P., Mallory, M.J., Kreitzer, D., Tuan, R.S., and Winter, E. (1994). SMK1, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* 8, 2151-2161.
- Kron, S.J., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1994). Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 5, 1003-1022.
- Kubler, E., Mosch, H.U., Rupp, S., and Lisanti, M.P. (1997). Gpa2p, a G-protein alpha-subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry* 272, 20321-20323.
- Kuchin, S., Vyas, V.K., and Carlson, M. (2002). Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate FLO11, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Molecular and cellular biology* 22, 3994-4000.
- Kuthan, M., Devaux, F., Janderova, B., Slaninova, I., Jacq, C., and Palkova, Z. (2003). Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Molecular microbiology* 47, 745-754.
- La Valle, R., and Wittenberg, C. (2001). A role for the Swe1 checkpoint kinase during filamentous growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 158, 549-562.
- Lamb, T.M., and Mitchell, A.P. (2003). The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 23, 677-686.
- Lambrechts, M.G., Bauer, F.F., Marmur, J., and Pretorius, I.S. (1996). Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8419-8424.
- Lee, S., Sode, K., Nakanishi, K., Marty, J.L., Tamiya, E., and Karube, I. (1992). A novel microbial sensor using luminous bacteria. *Biosensors & bioelectronics* 7, 273-277.
- Lehmann, M., Riedel, K., Adler, K., and Kunze, G. (2000). Amperometric measurement of copper ions with a deputy substrate using a novel *Saccharomyces cerevisiae* sensor. *Biosensors & bioelectronics* 15, 211-219.
- Leth, S.M., Simkus, R., Mattiasson, B., Corbisier, P., Klimant, I., Wolfbeis, O. S., Csoregi, E.: (2002). Engineered bacteria based biosensors for monitoring bioavailable heavy metals. *Electroanalysis* 14, 35-42.
- Levin, D.E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* 189, 1145-1175.
- Li, W., and Mitchell, A.P. (1997). Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* 145, 63-73.
- Liu, H., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth. *Genetics* 144, 967-978.

- Liu, Z., and Butow, R.A. (2006). Mitochondrial retrograde signaling. *Annual review of genetics* **40**, 159-185.
- Ljungdahl, P.O., Gimeno, C.J., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1992). SHR3: a novel component of the secretory pathway specifically required for localization of amino acid permeases in yeast. *Cell* **71**, 463-478.
- Lo, W.S., and Dranginis, A.M. (1996). FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin. *Journal of bacteriology* **178**, 7144-7151.
- Lo, W.S., and Dranginis, A.M. (1998). The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* **9**, 161-171.
- Lorenz, M.C., Cutler, N.S., and Heitman, J. (2000a). Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* **11**, 183-199.
- Lorenz, M.C., and Heitman, J. (1997). Yeast pseudohyphal growth is regulated by GPA2, a G protein alpha homolog. *The EMBO journal* **16**, 7008-7018.
- Lorenz, M.C., and Heitman, J. (1998a). The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* **17**, 1236-1247.
- Lorenz, M.C., and Heitman, J. (1998b). Regulators of pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* identified through multicopy suppressor analysis in ammonium permease mutant strains. *Genetics* **150**, 1443-1457.
- Lorenz, M.C., Pan, X., Harashima, T., Cardenas, M.E., Xue, Y., Hirsch, J.P., and Heitman, J. (2000b). The G protein-coupled receptor gpr1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**, 609-622.
- Macreadie, I.G., Horaitis, O., Verkuylen, A.J., and Savin, K.W. (1991). Improved shuttle vectors for cloning and high-level Cu(2+)-mediated expression of foreign genes in yeast. *Gene* **104**, 107-111.
- Madden, K., and Snyder, M. (1992). Specification of sites for polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae* and the influence of external factors on site selection. *Molecular biology of the cell* **3**, 1025-1035.
- Madhani, H.D., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1997). MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell* **91**, 673-684.
- Malcher, M., Schladebeck, S., and Mosch, H.U. (2011). The Yak1 protein kinase lies at the center of a regulatory cascade affecting adhesive growth and stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **187**, 717-730.
- Martin, S.G., and Arkowitz, R.A. (2014). Cell polarization in budding and fission yeasts. *FEMS microbiology reviews* **38**, 228-253.
- Martinez, L.R., and Fries, B.C. (2010). Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. *Current fungal infection reports* **4**, 266-275.
- Mascorro-Gallardo, J.O., Covarrubias, A.A., and Gaxiola, R. (1996). Construction of a CUP1 promoter-based vector to modulate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **172**, 169-170.
- Meunier, J.R., and Choder, M. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* colony growth and ageing: biphasic growth accompanied by changes in gene expression. *Yeast* **15**, 1159-1169.
- Mortimer, R.K., and Johnston, J.R. (1986). Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**, 35-43.

- Mosch, H.U., and Fink, G.R. (1997). Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 145, 671-684.
- Mosch, H.U., Kubler, E., Krappmann, S., Fink, G.R., and Braus, G.H. (1999). Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 10, 1325-1335.
- Mosch, H.U., Roberts, R.L., and Fink, G.R. (1996). Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 5352-5356.
- Nevzglyadova, O.V., Kuznetsova, I.M., Mikhailova, E.V., Artamonova, T.O., Artemov, A.V., Mittenberg, A.G., Kostyleva, E.I., Turoverov, K.K., Khodorkovskii, M.A., and Soidla, T.R. (2011). The effect of red pigment on the amyloidization of yeast proteins. *Yeast* 28, 505-526.
- Norton, S., D'Amore, T. (1994). Physiological effects of yeast cell immobilization: Applications for brewing. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 365-375
- Octavio, L.M., Gedeon, K., and Maheshri, N. (2009). Epigenetic and conventional regulation is distributed among activators of FLO11 allowing tuning of population-level heterogeneity in its expression. *PLoS genetics* 5, e1000673.
- Palecek, S.P., Parikh, A.S., Huh, J.H., and Kron, S.J. (2002). Depression of *Saccharomyces cerevisiae* invasive growth on non-glucose carbon sources requires the Snf1 kinase. *Molecular microbiology* 45, 453-469.
- Palkova, Z. (2004). Multicellular microorganisms: laboratory versus nature. *EMBO reports* 5, 470-476.
- Palkova, Z., Devaux, F., Ilicova, M., Minarikova, L., Le Crom, S., and Jacq, C. (2002). Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Molecular biology of the cell* 13, 3901-3914.
- Palkova, Z., and Forstova, J. (2000). Yeast colonies synchronise their growth and development. *Journal of cell science* 113 ( Pt 11), 1923-1928.
- Palkova, Z., Janderova, B., Gabriel, J., Zikanova, B., Pospisek, M., and Forstova, J. (1997). Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390, 532-536.
- Palkova, Z., and Vachova, L. (2003). Ammonia signaling in yeast colony formation. *International review of cytology* 225, 229-272.
- Palkova, Z., and Vachova, L. (2006). Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS microbiology reviews* 30, 806-824.
- Pan, X., and Heitman, J. (1999). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 19, 4874-4887.
- Pan, X., and Heitman, J. (2000). Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion. *Molecular and cellular biology* 20, 8364-8372.
- Pan, X., and Heitman, J. (2002). Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation. *Molecular and cellular biology* 22, 3981-3993.
- Peters, A.C., Wimpenny, J.W., and Coombs, J.P. (1987). Oxygen profiles in, and in the agar beneath, colonies of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus albus* and *Escherichia coli*. *Journal of general microbiology* 133, 1257-1263.



- Phan, V.T., Ding, V.W., Li, F., Chalkley, R.J., Burlingame, A., and McCormick, F. (2010). The RasGAP proteins Ira2 and neurofibromin are negatively regulated by Gpb1 in yeast and ETEA in humans. *Molecular and cellular biology* 30, 2264-2279.
- Pineda Rodo, A., Vachova, L., and Palkova, Z. (2012). In vivo determination of organellar pH using a universal wavelength-based confocal microscopy approach. *PloS one* 7, e33229.
- Purevdorj-Gage, B., Orr, M.E., Stoodley, P., Sheehan, K.B., and Hyman, L.E. (2007). The role of FLO11 in *Saccharomyces cerevisiae* biofilm development in a laboratory based flow-cell system. *FEMS yeast research* 7, 372-379.
- Ralser, M., Kuhl, H., Werber, M., Lehrach, H., Breitenbach, M., and Timmermann, B. (2012). The *Saccharomyces cerevisiae* W303-K6001 cross-platform genome sequence: insights into ancestry and physiology of a laboratory mutt. *Open biology* 2, 120093.
- Rando, O.J., and Verstrepen, K.J. (2007). Timescales of genetic and epigenetic inheritance. *Cell* 128, 655-668.
- Reaume, S.E., and Tatum, E.L. (1949). Spontaneous and nitrogen mustard-induced nutritional deficiencies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of biochemistry* 22, 331-338.
- Rebora, K., Desmoucelles, C., Borne, F., Pinson, B., and Daignan-Fornier, B. (2001). Yeast AMP pathway genes respond to adenine through regulated synthesis of a metabolic intermediate. *Molecular and cellular biology* 21, 7901-7912.
- Rechnitz, G.A. (1991). Biosensors into the 1990s. *Electroanalysis* 3, 73-76.
- Recht, J., Martinez, A., Torello, S., and Kolter, R. (2000). Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology* 182, 4348-4351.
- Reynolds, T.B. (2006). The Opi1p transcription factor affects expression of FLO11, mat formation, and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* 5, 1266-1275.
- Reynolds, T.B., and Fink, G.R. (2001). Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291, 878-881.
- Reynolds, T.B., Jansen, A., Peng, X., and Fink, G.R. (2008). Mat formation in *Saccharomyces cerevisiae* requires nutrient and pH gradients. *Eukaryotic cell* 7, 122-130.
- Ricicova, M., Kucerova, H., Vachova, L., and Palkova, Z. (2007). Association of putative ammonium exporters Ato with detergent-resistant compartments of plasma membrane during yeast colony development: pH affects Ato1p localisation in patches. *Biochimica et biophysica acta* 1768, 1170-1178.
- Ritchie, R.J., and Gibson, J. (1987). Permeability of ammonia and amines in *Rhodobacter sphaeroides* and *Bacillus firmus*. *Archives of biochemistry and biophysics* 258, 332-341.
- Roberts, R.L., and Fink, G.R. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes & development* 8, 2974-2985.
- Robertson, L.S., and Fink, G.R. (1998). The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13783-13787.
- Rupp, S., Summers, E., Lo, H.J., Madhani, H., and Fink, G. (1999). MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene. *The EMBO journal* 18, 1257-1269.
- Rutherford, J.C., Chua, G., Hughes, T., Cardenas, M.E., and Heitman, J. (2008). A Mep2-dependent transcriptional profile links permease function to gene expression during

pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* **19**, 3028-3039.

Ryan, O., Shapiro, R.S., Kurat, C.F., Mayhew, D., Baryshnikova, A., Chin, B., Lin, Z.Y., Cox, M.J., Vizeacoumar, F., Cheung, D., *et al.* (2012). Global gene deletion analysis exploring yeast filamentous growth. *Science* **337**, 1353-1356.

Saito, H., and Posas, F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics* **192**, 289-318.

Sarode, N., Miracle, B., Peng, X., Ryan, O., and Reynolds, T.B. (2011). Vacuolar protein sorting genes regulate mat formation in *Saccharomyces cerevisiae* by Flo11p-dependent and -independent mechanisms. *Eukaryotic cell* **10**, 1516-1526.

Selvig, K., and Alspaugh, J.A. (2011). pH Response Pathways in Fungi: Adapting to Host-derived and Environmental Signals. *Mycobiology* **39**, 249-256.

Shapiro, J.A. (1998). Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annual review of microbiology* **52**, 81-104.

Shapiro, J.A., and Hsu, C. (1989). *Escherichia coli* K-12 cell-cell interactions seen by time-lapse video. *Journal of bacteriology* **171**, 5963-5974.

Shetty, R.S., Deo, S.K., Liu, Y., and Daunert, S. (2004). Fluorescence-based sensing system for copper using genetically engineered living yeast cells. *Biotechnology and bioengineering* **88**, 664-670.

Sheu, Y.J., Barral, Y., and Snyder, M. (2000). Polarized growth controls cell shape and bipolar bud site selection in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **20**, 5235-5247.

Shimkets, L.J. (1990). Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiological reviews* **54**, 473-501.

Shively, C.A., Eckwahl, M.J., Dobry, C.J., Mellacheruvu, D., Nesvizhskii, A., and Kumar, A. (2013). Genetic networks inducing invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae* identified through systematic genome-wide overexpression. *Genetics* **193**, 1297-1310.

Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.

Sil, A., and Herskowitz, I. (1996). Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell* **84**, 711-722.

Smirnov, M.N., Smirnov, V.N., Budowsky, E.I., Inge-Vechtomov, S.G., and Serebrjakov, N.G. (1967). Red pigment of adenine-deficient yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications* **27**, 299-304.

Soares, E.V. (2011). Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Journal of applied microbiology* **110**, 1-18.

Song, Q., Johnson, C., Wilson, T.E., and Kumar, A. (2014). Pooled segregant sequencing reveals genetic determinants of yeast pseudohyphal growth. *PLoS genetics* **10**, e1004570.

Song, Q., and Kumar, A. (2012). An Overview of Autophagy and Yeast Pseudohyphal Growth: Integration of Signaling Pathways during Nitrogen Stress. *Cells* **1**, 263-283.

Sreenivas, A., and Carman, G.M. (2003). Phosphorylation of the yeast phospholipid synthesis regulatory protein Opi1p by protein kinase A. *The Journal of biological chemistry* **278**, 20673-20680.

St'ovicek, V., Vachova, L., Kuthan, M., and Palkova, Z. (2010). General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies. *Fungal genetics and biology : FG & B* **47**, 1012-1022.

- Stloukal, R.R., M.; Rebroš M. (2007). Method for industrial production of biocatalysts in the form of enzymes or microorganisms immobilized in polyvinyl alcohol gel, their use and devices for their production. WO/2007/104268.
- Stloukal, R.V., I., Watzková, J., Gregušová, B., Palková, Z., Váchová, L., Pichová I. (2014). Uplatněná certifikovaná metodika: Metodika užití jednorázového setu pro detekci měďnatých (Cu<sup>2+</sup>) iontů v pitných a průmyslových odpadních vodách, s. 24.
- Stovicek, V., Vachova, L., Begany, M., Wilkinson, D., and Palkova, Z. (2014). Global changes in gene expression associated with phenotypic switching of wild yeast. *BMC genomics* 15, 136.
- Strachotová, D. (2012). Studium mechanismů produkce amoniaku u kvasinkových kolonií a tekutých kultur. Dizertační práce.
- Strassmann, J.E., and Queller, D.C. (2011). Evolution of cooperation and control of cheating in a social microbe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 Suppl 2, 10855-10862.
- Stratford, M., and Assinder, S. (1991). Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. *Yeast* 7, 559-574.
- Stratford, M., Coleman, H.P., and Keenan, M.H. (1988). Yeast flocculation: a dynamic equilibrium. *Yeast* 4, 199-208.
- Strittmatter, A.W., Fischer, C., Kleinschmidt, M., and Braus, G.H. (2006). FLO11 mediated filamentous growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* depends on the expression of the ribosomal RPS26 genes. *Molecular genetics and genomics* : MGG 276, 113-125.
- Taheri, N., Kohler, T., Braus, G.H., and Mosch, H.U. (2000). Asymmetrically localized Bud8p and Bud9p proteins control yeast cell polarity and development. *The EMBO journal* 19, 6686-6696.
- Tekaya, N., Saiapina, O., Ben Ouada, H., Lagarde, F., and Jaffrezic-Renault, N. (2013). Ultra-sensitive conductometric detection of heavy metals based on inhibition of alkaline phosphatase activity from *Arthrospira platensis*. *Bioelectrochemistry* 90, 24-29.
- Teunissen, A.W., and Steensma, H.Y. (1995). Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast* 11, 1001-1013.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J.D., McMullen, B., Hurwitz, M., Krebs, E.G., and Wigler, M. (1987a). Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 7, 1371-1377.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., and Wigler, M. (1987b). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50, 277-287.
- Torbensen, R., Moller, H.D., Gresham, D., Alizadeh, S., Ochmann, D., Boles, E., and Regenber, B. (2012). Amino acid transporter genes are essential for FLO11-dependent and FLO11-independent biofilm formation and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS one* 7, e41272.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry* 67, 509-544.
- Vachova, L., Devaux, F., Kucerova, H., Ricicova, M., Jacq, C., and Palkova, Z. (2004). Sok2p transcription factor is involved in adaptive program relevant for long term survival of *Saccharomyces cerevisiae* colonies. *The Journal of biological chemistry* 279, 37973-37981.
- Vachova, L., Chernyavskiy, O., Strachotova, D., Bianchini, P., Burdikova, Z., Fercikova, I., Kubinova, L., and Palkova, Z. (2009a). Architecture of developing multicellular yeast colony:

- spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. *Environmental microbiology* **11**, 1866-1877.
- Vachova, L., Kucerova, H., Devaux, F., Ulehlova, M., and Palkova, Z. (2009b). Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environmental microbiology* **11**, 494-504.
- Vachova, L., and Palkova, Z. (2005). Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *The Journal of cell biology* **169**, 711-717.
- Vachova, L., Stovicek, V., Hlavacek, O., Chernyavskiy, O., Stepanek, L., Kubinova, L., and Palkova, Z. (2011). Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. *The Journal of cell biology* **194**, 679-687.
- van Dyk, D., Hansson, G., Pretorius, I.S., and Bauer, F.F. (2003). Cellular differentiation in response to nutrient availability: The repressor of meiosis, Rme1p, positively regulates invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **165**, 1045-1058.
- van Dyk, D., Pretorius, I.S., and Bauer, F.F. (2005). Mss11p is a central element of the regulatory network that controls FLO11 expression and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **169**, 91-106.
- Van Nuland, A., Vandormael, P., Donaton, M., Alenquer, M., Lourenco, A., Quintino, E., Versele, M., and Thevelein, J.M. (2006). Ammonium permease-based sensing mechanism for rapid ammonium activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Molecular microbiology* **59**, 1485-1505.
- Verstrepen, K.J., and Fink, G.R. (2009). Genetic and epigenetic mechanisms underlying cell-surface variability in protozoa and fungi. *Annual review of genetics* **43**, 1-24.
- Vopalenska, I., Hulkova, M., Janderova, B., and Palkova, Z. (2005). The morphology of *Saccharomyces cerevisiae* colonies is affected by cell adhesion and the budding pattern. *Research in microbiology* **156**, 921-931.
- Vopalenska, I., St'ovicek, V., Janderova, B., Vachova, L., and Palkova, Z. (2010). Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture. *Environmental microbiology* **12**, 264-277.
- Vopalenska, I., Vachova, L., and Palkova, Z. (2015). New biosensor for detection of copper ions in water based on immobilized genetically modified yeast cells. *Biosensors & bioelectronics* **72**, 160-167.
- Vopálenká, I., Palková, Z., Váchová, L.; Způsob modifikace detekčního kvasinkového kmene. CZ 305223, patent. Praha (2015). (majitelem je Univerzita Karlova v Praze a Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., datum zápisu 6. 5. 2015)
- Vorlop, K.-D., Jekel, M. (1998). Process for preparing a biocatalyst with a polyvinyl alcohol gel and biocatalyst produced by this process. German patent DE 198 27 552 C1. .
- Voynov, V., Verstrepen, K.J., Jansen, A., Runner, V.M., Buratowski, S., and Fink, G.R. (2006). Genes with internal repeats require the THO complex for transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 14423-14428.
- Vyas, V.K., Kuchin, S., Berkey, C.D., and Carlson, M. (2003). Snf1 kinases with different beta-subunit isoforms play distinct roles in regulating haploid invasive growth. *Molecular and cellular biology* **23**, 1341-1348.
- Ward, M.P., Gimeno, C.J., Fink, G.R., and Garrett, S. (1995). SOK2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Molecular and cellular biology* **15**, 6854-6863.

- Watari, J., Takata, Y., Ogawa, M., Sahara, H., Koshino, S., Onnela, M.L., Airaksinen, U., Jaatinen, R., Penttilä, M., and Keranen, S. (1994). Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene FLO1. *Yeast* 10, 211-225.
- Webb, A.D.I., J.L. (1963). Fusel oil. *Adv Appl Microbiol* 5, 317–353.
- Webber, A.L., Lambrechts, M.G., and Pretorius, I.S. (1997). MSS11, a novel yeast gene involved in the regulation of starch metabolism. *Current genetics* 32, 260-266.
- Weisman, L.S., Bacallao, R., and Wickner, W. (1987). Multiple methods of visualizing the yeast vacuole permit evaluation of its morphology and inheritance during the cell cycle. *The Journal of cell biology* 105, 1539-1547.
- Wimpenny, J. (2009). Microbial metropolis. *Advances in microbial physiology* 56, 29-84.
- Winzeler, E.A., Castillo-Davis, C.I., Oshiro, G., Liang, D., Richards, D.R., Zhou, Y., and Hartl, D.L. (2003). Genetic diversity in yeast assessed with whole-genome oligonucleotide arrays. *Genetics* 163, 79-89.
- Wolf, J.J., Dowell, R.D., Mahony, S., Rabani, M., Gifford, D.K., and Fink, G.R. (2010). Feed-forward regulation of a cell fate determinant by an RNA-binding protein generates asymmetry in yeast. *Genetics* 185, 513-522.
- Xu, W., Smith, F.J., Jr., Subaran, R., and Mitchell, A.P. (2004). Multivesicular body-ESCRT components function in pH response regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell* 15, 5528-5537.
- Yoshida, K., Inoue, K., Takahashi, Y., Ueda, S., Isoda, K., Yagi, K., and Maeda, I. (2008). Novel carotenoid-based biosensor for simple visual detection of arsenite: characterization and preliminary evaluation for environmental application. *Applied and environmental microbiology* 74, 6730-6738.
- Yuce, M., Nazir, H., and Donmez, G. (2010). A voltammetric *Rhodotorula mucilaginosa* modified microbial biosensor for Cu(II) determination. *Bioelectrochemistry* 79, 66-70.

## **8 PŘÍLOHA - PUBLIKACE**

---

# The morphology of *Saccharomyces cerevisiae* colonies is affected by cell adhesion and the budding pattern

Irena Vopálenská, Marta Hůlková, Blanka Janderová\*, Zdena Palková

Department of Genetics and Microbiology, Charles University, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic

Received 4 February 2005; accepted 10 May 2005

Available online 14 July 2005

---

## Abstract

Formation of organized colony morphology is clearly a result of organized, coordinated behavior of cells within a colony, which reflects changes in the cell environment, nutrient availability, inter- and intracolony signaling and others. Under standard conditions, colony morphology is specific to the particular yeast strain, which indicates that reproducibility of the structure appears to be a hallmark of programmed development. Our data indicate that markedly structured morphology of colonies formed by some haploid and diploid *Saccharomyces cerevisiae* strains is linked to formation of clusters of incompletely separated yeast cells organized into larger aggregates. A prerequisite to aggregate formation appears to be a monopolar budding pattern and the presence of an extracellular matrix and adhesins connecting individual clusters within aggregates. In contrast, less structured colonies of other strains are composed of non-aggregated cells exhibiting different modes of budding (axial/polar/random) in different colony areas. The budding pattern appears to be influenced more by the environment (the presence of surrounding cells, nutrient gradients, etc.) than by strain ploidy. Disruption of the *BUD2* gene results in uniform random budding of cells and it partially influences colony morphology.

© 2005 Elsevier SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Colony morphology; Budding pattern; Cell aggregates; Cell clusters

---

## 1. Introduction

Microorganisms including yeasts, when growing on solid media, organize themselves into colonies, which are variable in appearance. Colonies formed by cells of different yeast genera can be smooth, fluffy, rough, slimy, etc., depending on the ability of the particular yeast to form capsules or other extracellular matrix material, as well as on the capability of the cells to enter different stages of the yeast life cycle, e.g., mating, sporulation or pseudohyphal growth. Another contributing factor may be the variability in the shapes of cells in the whole colony or in different parts of the colony. Dimorphic yeast-to-mycelial transitions and the relative ratio of the two forms can significantly affect colony morphology. Scanning electron microscopy of *Candida*

*albicans* colonies showed yeast-like cells, pseudohyphae and true hyphae in various layers of the colony. These cells can be connected by extracellular material forming fibrillar structures [25,33]. *Saccharomyces cerevisiae* yeast-to-pseudohyphal transition resulting from activation of the epigenetically silenced *FLO* gene family also affects colony morphology. This change is related to variation in cell wall glycoproteins [11]. Varon and Choder [32] observed thin fibrils forming a global network, which may mediate cell–cell communication in starving colonies of *S. cerevisiae* laboratory strains. In contrast to smooth colonies of most laboratory strains, *S. cerevisiae* strains isolated from natural or industrial environments form colonies with fluffy morphology [2,15,16], resembling those of some of the “non-conventional” yeasts (*Candida* sp., *Kluyveromyces* sp.). This appears to be connected to the production of an extracellular matrix possibly involved in cell–cell interactions. Under laboratory conditions, fluffy morphology is efficiently switched to the smooth morphology indistinguishable from that of labora-

---

\* Corresponding author.

E-mail address: [blankaj@natur.cuni.cz](mailto:blankaj@natur.cuni.cz) (B. Janderová).

tory strains. This domestication is accompanied by loss of extracellular matrix production and specific changes in gene expression [16].

A remarkable phenomenon is the variability in the appearance of giant colonies growing on the surface of an agar medium from cell suspension spots. Like morphologies of monoclonies (colonies rising from one cell), morphologies of giant colonies growing under particular conditions were also found to be reproducible and characteristic of individual yeast species and even individual strains [15]. Even laboratory *S. cerevisiae* strains which are thought to produce simple-structured colonies can form colonies with a morphology that is in fact not necessarily simple. Particularly in older colonies, different central or radial grooves, sectors and papillae are visible [8]. Colonies with remarkable morphology differing from the usual smooth ones can also be formed by some *S. cerevisiae* diploid laboratory strains (e.g.,  $\Sigma$ 1278 strain) growing under specific conditions on nitrogen-poor media [9].

One of the factors that could play a role in colony formation is the budding pattern of the cells. Budding of *S. cerevisiae* growing in exponential liquid cultures occurs by two internally programmed spatial patterns. Haploid cells bud axially (a new bud arises adjacent to the birth scar or the previous one). Diploid cells bud in a polar pattern in which cells bud only on the pole opposite the pole with the birth scar (monopolar budding) or on both poles (bipolar budding) (for review [12,13]). The choice of the bud site in all cell types is governed by general bud-site selection proteins: Bud1p (Ras-like GTPase), Bud2p (GTPase-activating protein for Bud1p) [23] and Bud5p (GDP–GTP exchange factor for Bud1p) [34] constituting a functional GTPase module. Components of this module may interact with axial- or polar-specific components to establish cell type-specific budding patterns [12]. In the absence of any of the corresponding genes, the cell (either haploid or diploid) loses its ability to select a proper bud position and buds randomly [1,12]. Most of these data come from studies of *S. cerevisiae* cells growing in liquid media. However, little is known about the budding pattern of cells growing in colonies on solid media.

Changes in the budding pattern are important during the switch of diploid *S. cerevisiae* strains to pseudohyphal growth under nitrogen starvation. The change from bipolar to monopolar budding, where buds are formed on a single pole of the mother cell, results in the formation of pseudohyphae and the remarkably hairy appearance of the colony [9]. Transition of *Candida mogii* cells from pseudohyphal to yeast-like form was observed after induction of colonies to intensive ammonia production and was accompanied by pronounced changes in overall colony morphology. Here, pseudohyphal cells formed a smooth colony, while yeast-like cells formed a ruffled “spaghetti-like” structure [21].

The budding pattern of yeast cells in liquid medium is affected by the external environment. Haploid cells reaching a stationary phase preferentially select sites for polarized growth opposite the previous bud scar when placed in fresh

medium. This means that they “forgot” the regular axial budding pattern under conditions of a prolonged G1 phase (or entering the G0) [13,18]. This raises the question of how the axial/bipolar budding rules come into use within colonies, where the cells are most affected by their neighbors and exponential growth may be a rare event, especially in later developmental phases.

Here we show that budding rules in yeast colonies of various *Saccharomyces cerevisiae* strains significantly differ from those of cells growing in liquid cultures. The morphology of colonies appears to be more strongly influenced by surface properties of cells and their ability to grow in monopolar manner than by axial/polar/random budding differences.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Yeast strains and plasmid

Haploid and diploid *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1. Vector FD58 (pUC19 with the 4.9-kbp *Bam*HI–*Pst*I fragment carrying the *BUD2* gene, where its internal *Bgl*III fragment containing most of the coding sequence was replaced by *LEU2* gene [3], and obtained by courtesy of F. Cvrčková (Charles University, Prague, Czech Republic)) was used for disruption of the *BUD2* gene by one-step gene replacement [28].

### 2.2. Media and cultivation

The cells used for determination of the budding pattern were cultivated to exponential growth phase in YEPG liquid medium [5]. Giant colonies and monoclonies were grown on GM-agar [22] or Gman-agar (3% (w/v) mannose instead of 3% (w/v) glycerol in GM-agar) at 22 or 28 °C. Giant colonies were inoculated by the dropping (7  $\mu$ l) of cell suspension (approx. density  $10^7$  cells ml<sup>-1</sup>) on agar in pairs at a distance of 1.5 cm. Monoclonies were inoculated by a properly diluted suspension. Appearance of the colonies was followed over the course of one month.

### 2.3. Genetic techniques

Sporulation and mating conditions were as described previously [5]. The disruption allele was cut out of the vector FD58 by *Bam*HI and *Pst*I, the fragment was isolated from agarose gel and used for yeast transformation. Yeast transformation was carried out using the alkali cation method [7]. Selection of transformants was performed on minimal medium [19] with 50  $\mu$ l ml<sup>-1</sup> of necessary supplements without leucine. The correct disruption of the gene was confirmed by PCR and by Calcofluor staining of bud scars of the respective strain growing in liquid medium (scars were distributed randomly over the cell surface). For



Table 1  
*S. cerevisiae* strains used in this study

Strain	Original designation	Genotype	Source/reference <sup>a</sup>
<b>Haploids</b>			
YPH <sup>h</sup>	YPH499	MATa, ade2, his3, leu2-Δ1, lys2, trp1, ura3	[29]
OL <sup>h</sup>	OL1	MATα, his3, leu2, ura3	E.C. Hurt
OB <sup>h</sup>	OB85	MATα, ade2, leu2-Δ1, ura3-52	V. Larionov
15B <sup>h</sup>	15B-AT34	MATa, his3, leu2-3,112, trp1	V. Larionov
78 <sup>h</sup>	78	MATα, his4, leu2-3,112, ura	G.R. Fink
GRF <sup>h</sup>	GRF18	MATα, his3, leu2-3,112	G.R. Fink
KT <sup>h</sup>	KT308	MATα, RAS <sup>+</sup> , his3, leu2, lys1, lys2, trp1, ura3	A. Pichová
ΣS <sup>h</sup>		MATa	This study, haploid from Σ1278 <sup>d</sup>
ΣSGH <sup>h</sup>		MATα, leu2-3,112	This study, haploid from ΣSG <sup>d</sup>
P1 <sup>h</sup>		MATα, leu2-3,112	This study, haploid from P23 <sup>d</sup>
P2 <sup>h</sup>		MATa, leu2-3,112	This study, haploid from P23 <sup>d</sup>
<b>Diploids</b>			
Σ1278 <sup>d</sup>	Σ1278	MATa/MATα	H. Sychrová
ΣSG <sup>d</sup>		MATa/MATα	This study, mating ΣS <sup>h</sup> and GRF <sup>h</sup>
P23 <sup>d</sup>	P23-23	MATa/MATα, leu2-3,112	DMUP
PD <sup>d</sup>		MATa/MATα, leu2-3,112	This study, mating P1 <sup>h</sup> and P2 <sup>h</sup>

<sup>a</sup> E.C. Hurt, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, FRG; V. Larionov, Institute of Cytology, AS USSR, Leningrad, Russia; G.R. Fink, Whitehead Institute for Biomedical research, MIT, Massachusetts, USA; A. Pichová, Institute of Microbiology AS CR, Praha, Czech Republic; DMUP, The yeast collection of Department Genetics and Microbiology, Charles University, Praha, Czech Republic; H. Sychrová, Institute of Physiology, AS CR, Praha, Czech Republic.

<sup>h</sup> Haploid.

<sup>d</sup> Diploid.

PCR we used forward primer BUD2 A (5'-CATGTCTG-ATCTGGTGGAGC-3' = 395–414 nt of the *BUD2* gene sequence in front of the *Bgl*II site) and reverse primers BUD2 B (5'-CGGCAGGTCATTACTCGTTG-3' = 2935–2914 nt in the *Bgl*II–*Bgl*II part of the *BUD2* gene sequence) and LEU2 (5'-AATCTGGAGCAGAACCGTGG-3' = 880–861 nt in the *LEU2* gene in *Bam*HI–*Pst*I fragment of the FD58 vector). Micromanipulation of the cells was done under the microscope by a Carl Zeiss micromanipulator, Jena, Germany.

#### 2.4. Staining of invasively growing colonies

The colonies were washed from the agar medium by a streak of water and the plate was overlaid for 1 h with a solution containing 1.25 g Coomassie blue, 200 ml methanol and 50 ml acetic acid in 500 ml of solution. Then the plate was washed several times for 15 min by water and decolorized by solution containing, in 500 ml, 25 ml of methanol and 37.5 ml of acetic acid. The cells invading agar were photographed.

#### 2.5. Determination of budding pattern

The budding pattern of cells from liquid culture or those picked up from colonies was determined by bud scar staining in 30 µl of a 2 µM solution of Calcofluor White M2R (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Cells were washed twice by demineralized water and observed using a Leica DMR fluorescent microscope (Leica Microsystems), UV filter “A” and 40x objective. Cells with no more than 6 bud

scars were evaluated. Four categories of budding pattern were distinguished: (i) axially budding cells had scars in close proximity on one cell pole (adjacent to the birth scar); (ii) monopolarly budding cells had scars on the pole opposite the pole with the birth scar; (iii) bipolarly budding cells had scars on both cell poles; and (iv) randomly budding cells had scars randomly on the whole surface of the cell. If possible, the budding pattern was confirmed by evaluation of cell arrangement in clusters. 70–360 cells were scored in each evaluation.

#### 2.6. Cell adherence assay (modified according to Stratford [30])

Cells from colonies suspended in water (at a concentration of  $1\text{--}4 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ ) were harvested by centrifugation, washed twice with 5 ml of water or 0.25M EDTA (with vigorous mixing for 30 s) and resuspended in 2 ml of the same solution. The presence of individual cells, cell clusters and cell aggregates was observed under the microscope.

#### 2.7. Photography of colonies

Colonies were photographed either with illuminating light coming from above (morphology of colonies) or through a plate (invasive growth). A Hitachi HV-C20 color camera with Cosmicar or Navitar lenses, Fiber-Lite PL-800 and Kaiser Prolite illumination system and Lucia G/F software (Laboratory Imaging s.r.o., Prague) were used. The cells were photographed using a Cohn high performance CCD camera and an Olympus BX60 microscope with a 40x lens.

### 3. Results

#### 3.1. Morphology of giant colonies and monoclonies formed by haploid and diploid laboratory *S. cerevisiae* strains

From our yeast collection, we selected 7 haploid and two diploid *S. cerevisiae* laboratory strains (Table 1), the giant colonies of which exhibit slightly or distinctly structured colony morphologies when growing on GM-agar medium. We selected strains with different genetic backgrounds in order to obtain enough data to be able to distinguish general rules of colony formation from variability noise. To complete the strain collection, we prepared other strains in this study. They included six haploid and diploid strains derived from the parental diploids  $\Sigma 1278^d$ ,  $P23^d$  and haploid  $GRF^h$  by dissection of diploids and by crossing of haploid strains (Table 1).

Giant colonies of all *S. cerevisiae* strains were cultivated on solid GM-agar for 31 days at 28 °C or at the laboratory temperature (22 °C) where structures of colonies are usually more prominent. All seven haploid strains ( $YPH^h$ ,  $OL^h$ ,  $OB^h$ ,  $15B^h$ ,  $78^h$ ,  $GRF^h$ , and  $KT^h$ —Fig. 1) as well as haploid ( $P1^h$ ,  $P2^h$ ) and diploid ( $P1 \times P2^d$ ) strains derived from the diploid  $P23^d$  (data not shown) formed faintly structured giant colonies with central concentric mounds and radial grooves and usually contained sectors or papillae.  $\Sigma 1278^d$  and derived haploid strains  $\Sigma S^h$  and  $\Sigma SGH^h$ , irrespective of their ploidy, formed markedly structured fluffy colonies with vertical structures topping the colony surface and resembling “aerial guts” of the wild diploid strain *S. cerevisiae* BR-F [16]. On the contrary, the diploid  $\Sigma SG^d$  formed nearly smooth, compact colonies without “aerial guts” (Fig. 2). Hence, colony morphology bore no simple relationship to the ploidy of cells.

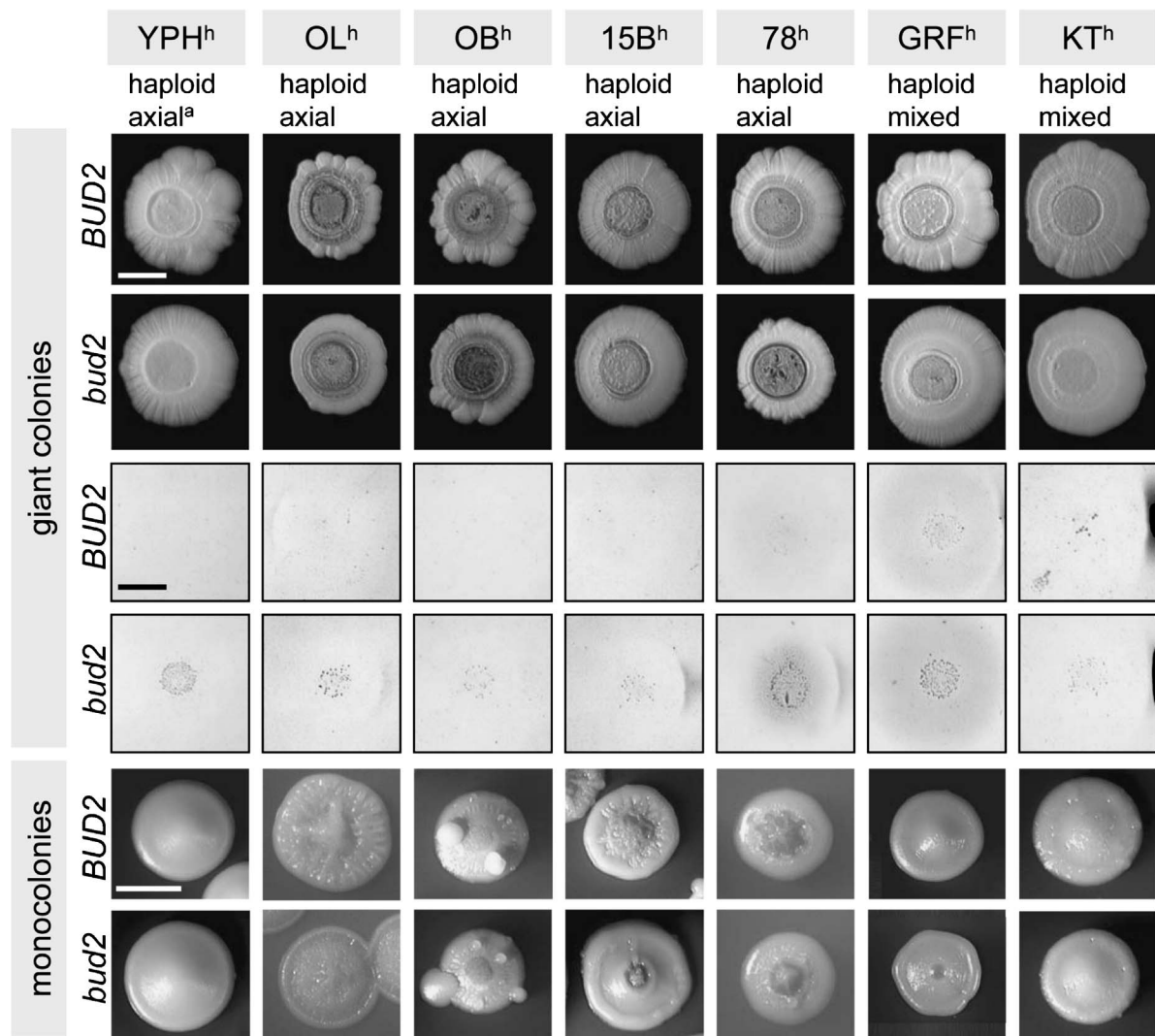


Fig. 1. Colony morphology and invasiveness of haploid *S. cerevisiae* strains growing on GM-agar. *BUD2*, parental strains; *bud2*, strains with interrupted *BUD2* gene. Giant colonies were photographed after 31 days at 22 °C, invasive growth of giant colonies was detected after 22 days (or 36 days for strain  $78^h$ ) of cultivation at 28 °C, bars = 5 mm. Monocolonies grew at a density of 100–140 per plate for 24 days at 28 °C, bar = 2 mm.

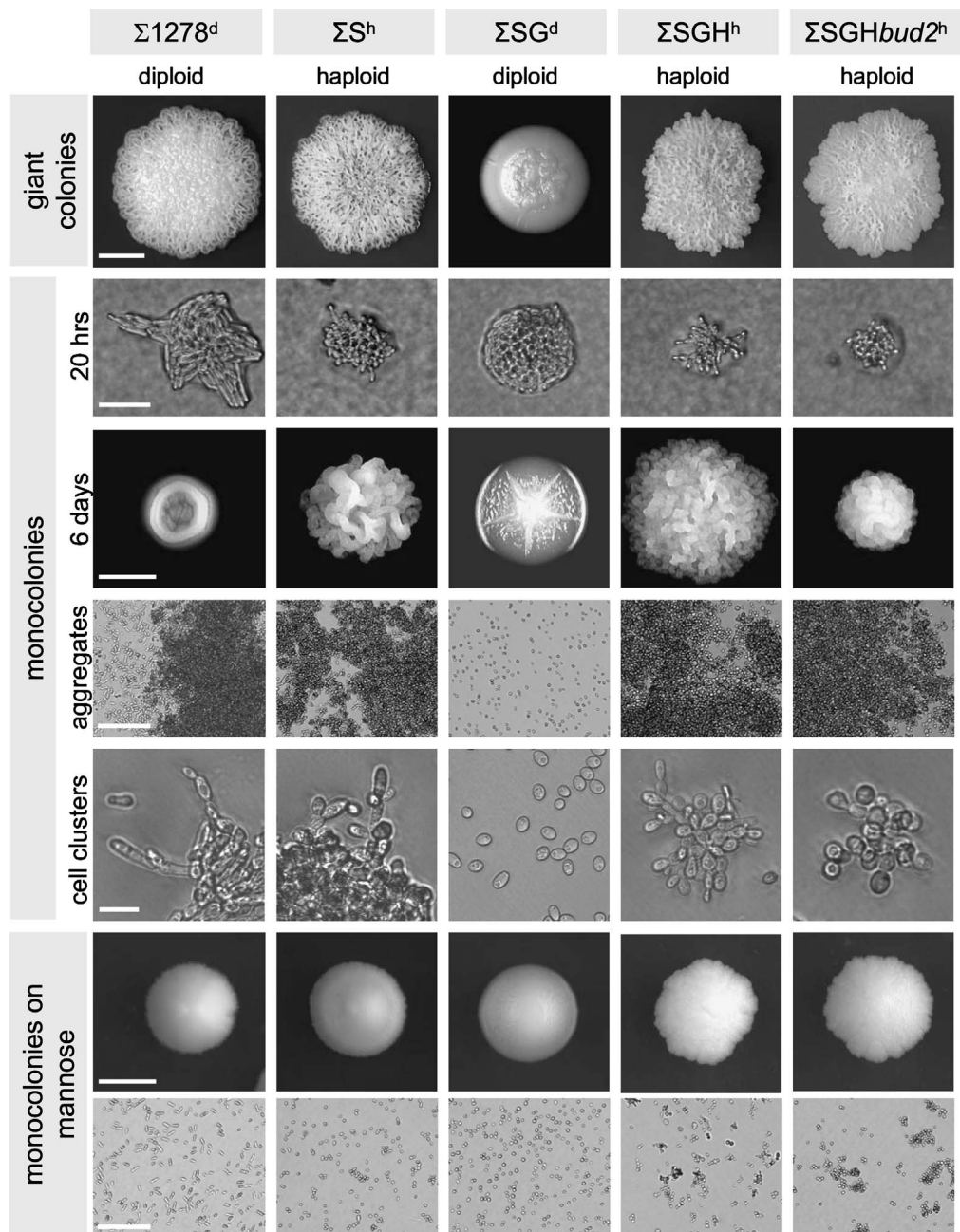


Fig. 2. Colony morphology and cell–cell aggregation of haploid and diploid *S. cerevisiae* strains. Giant colonies on GM-agar were photographed after 13 days at 28 °C, bar = 5 mm. Monocolonies grew at a density of 2–8 per plate for 20 h (bar = 30  $\mu$ m) or 6 days on GM-agar (bar = 2 mm). Giant aggregates (bar = 100  $\mu$ m) and cell clusters (bar = 10  $\mu$ m) are from 6-day-old monocolonies. Monocolonies grew for 6 days on Gman-agar (bar = 2 mm) and cells were picked up (bar = 100  $\mu$ m).

Giant colonies arise from drops of cell suspension placed on agar medium. The colony structure might therefore, to some extent, be determined by the initial cell density influencing the “living” space of individual cells at the beginning of giant colony development. In contrast to this, development of monocolonies is not usually affected by cell density at early developmental stages (with the exception of an extremely high density of plating). Nevertheless, the later development and morphology of monocolonies depends on their density, i.e., on distances between monocolonies and

their growth space. Usually, denser plating (or accidentally closely growing colonies) of *S. cerevisiae* laboratory strains result in formation of smaller and more structured colonies, while thinly-spread colonies are as a rule nearly smooth. The outward complexity in colony structure thus decreases with larger distance from neighboring colonies.

In order to compare the morphology of monocolonies of selected strains, we plated them at two different densities (approx. 30–60 cells/plate and 100–140 cells/plate), and in parallel, we prepared monocolonies placed at the cen-

tre of an agar plate by micromanipulation, to completely avoid the effects of the presence of surrounding colonies. We then analyzed, over a period of 14–24 days, the morphology of monoclonal colonies of all haploid and diploid strains. As predicted, solitary colonies of most of the strains (YPH<sup>h</sup>, OL<sup>h</sup>, OB<sup>h</sup>, 15B<sup>h</sup>, 78<sup>h</sup>, GRF<sup>h</sup>, KT<sup>h</sup>) exhibited nearly smooth morphology even after 30 days of cultivation (data not shown). The morphology variations in more dense (100–140 colonies per plate) plated colonies of several individual strains are shown in Fig. 1. Only one strain (YPH<sup>h</sup>) formed nearly smooth colonies. The colonies of other strains exhibited more structured morphology when plated at higher density.

A significant effect of different plating density on colony structure was also observed on fluffy monoclonal colonies of strain  $\Sigma 1278^d$  and derived haploids  $\Sigma S^h$  and  $\Sigma SGH^h$  (Fig. 2). The colonies growing at higher density had more developed “aerial guts” topping the colony surface at early growth phases, while the solitary colony formed comparable “aerial guts” only later.

### 3.2. Budding pattern of selected *S. cerevisiae* laboratory strains in liquid medium and within colonies on solid medium

The staining of bud scars by Calcofluor white M2R was used to ascertain whether budding of the selected strains growing in liquid medium corresponded to their ploidy, i.e., if all haploid strains budded axially and all diploid strains exhibited polar budding. Seven of the eleven haploid strains tested budded axially (YPH<sup>h</sup>, OL<sup>h</sup>, OB<sup>h</sup>, 15B<sup>h</sup>, 78<sup>h</sup>, P1<sup>h</sup>, P2<sup>h</sup>—Table 2A) with typical chains of bud scars. In contrast, the percentage of axial budding of strains GRF<sup>h</sup> and KT<sup>h</sup> was low (31 and 25%, respectively), while their bipolar and random budding was quite frequent (Table 2A). The cultures of haploids derived from parental diploid  $\Sigma 1278^d$  were non-homogeneous and contained, in addition to individual cells, cell clusters (several cells non-separated in mother–daughter junctions). Haploid  $\Sigma S^h$  formed small cell clusters where the cells in the centre budded axially (89% of the cells) while some of the cells at the periphery were elongated and exhibited monopolar budding (10%). Strain  $\Sigma SGH^h$  formed large cell clusters, the cells of which were hard to distinguish, and therefore it was not possible to determine exact budding ratios. Most of the cells at the cluster periphery budded monopolarly, while axially budding cells were found infrequently only in dispersed cell clusters. Budding of diploid strains was polar (Table 2A). Diploid *S. cerevisiae* P23<sup>d</sup> showed 95% polar budding (54% bipolar, 41% monopolar), diploid PD<sup>d</sup> predominantly a bipolar type of budding (67% bipolar, 20% monopolar), diploid  $\Sigma 1278^d$  predominantly monopolar budding (85% monopolar, 14% bipolar) and diploid  $\Sigma SG^d$  47% bipolar and 49% monopolar budding. Most of  $\Sigma 1278^d$  monopolarly budding cells formed small cell clusters.

No data are currently available on the budding pattern of cells within colonies or on possible differences in

Table 2

The budding pattern of *S. cerevisiae* strains in liquid medium, in different parts of giant colonies and in monoclonal colonies growing on GM-agar for 26 days

Strain	Ploidy	Budding in	A (%)	P (%)	R (%)
A					
YPH <sup>h</sup>	n	Liquid	100	0	0
OL <sup>h</sup>	n	Liquid	98	2	0
		Giant colony Periphery	61	36	3
		Central mound	61	23	16
		Monoclonony	57	31	12
OB <sup>h</sup>	n	Liquid	97	3	0
15B <sup>h</sup>	n	Liquid	95	4	1
		Giant colony Periphery	74	19	7
		Central mound	36	36	28
		Monoclonony	45	37	18
78 <sup>h</sup>	n	Liquid	90	7	3
		Giant colony Periphery	88	11	1
		Central mound	59	35	6
		Monoclonony	88	7	5
GRF <sup>h</sup>	n	Liquid	31	25 <sup>a</sup>	44
KT <sup>h</sup>	n	Liquid	25	50 <sup>a</sup>	25
ΣS <sup>h</sup>	n	Liquid	89	10	1
ΣSGH <sup>h</sup>	n	Liquid	nd	nd	nd
P1 <sup>h</sup>	n	Liquid	98	2	0
P2 <sup>h</sup>	n	Liquid	97	3	0
Σ1278 <sup>d</sup>	2n	Liquid	0	99	1
		Giant colony Periphery	0	99	1
		Central mound	0	90	10
ΣSG <sup>d</sup>	2n	Liquid	0	96	4
		Giant colony Periphery	0	97	3
		Central mound	0	76	24
P23 <sup>d</sup>	2n	Liquid	0	95	5
PD <sup>d</sup>	2n	Liquid	0	87	13
		Giant colony Periphery	0	76	24
		Central mound	0	64	36
B					
YPH <i>bud2</i> <sup>h</sup>	n	Liquid	0	0	100
OL <i>bud2</i> <sup>h</sup>	n	Liquid	0	0	100
OB <i>bud2</i> <sup>h</sup>	n	Liquid	0	0	100
15B <i>bud2</i> <sup>h</sup>	n	Liquid	0	0	100
78 <i>bud2</i> <sup>h</sup>	n	Liquid	0	1	99
GRF <i>bud2</i> <sup>h</sup>	n	Liquid	0	2	98
KT <i>bud2</i> <sup>h</sup>	n	Liquid	6	0	94
ΣSGH <i>bud2</i> <sup>h</sup>	n	Liquid	nd	nd	nd
P1 <i>bud2</i> <sup>h</sup>	n	Liquid	0	0	100
P2 <i>bud2</i> <sup>h</sup>	n	Liquid	0	0	100
PD <i>bud2</i> <sup>d</sup>	2n	Liquid	0	9	91

A, axial budding; P, polar budding; R, random budding; nd, not determined.

<sup>a</sup> Distinguishing between polar and random budding was difficult because of nearly round cell shape. 70–360 cells were evaluated for each strain.

<sup>h</sup> Haploid.

<sup>d</sup> Diploid.

the budding of cells in different parts of a colony during colony development. We explored the budding pattern of cells collected from 26-day-old giant colonies of selected strains. These were chosen on the basis of the differing appearance of their giant colonies, i.e., three haploid strains (OL<sup>h</sup>, 15B<sup>h</sup>, 78<sup>h</sup>) exhibiting axial budding in liquid medium and faintly structured colonies, and three diploid

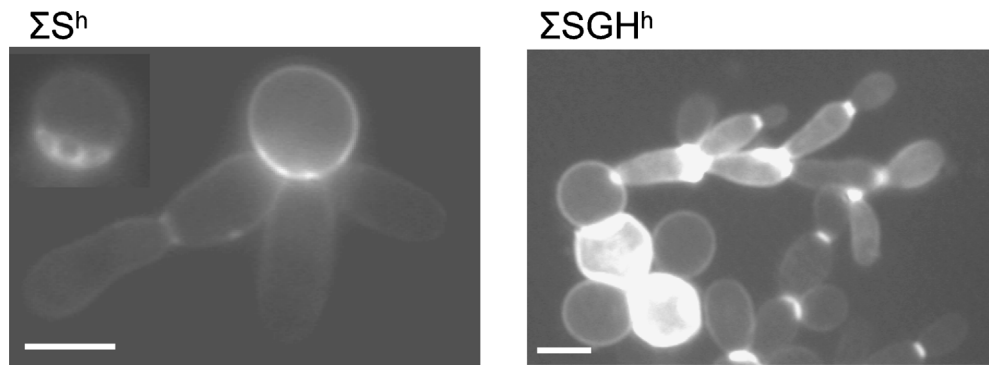


Fig. 3. Switching of round to elongated cells in either giant colonies of a 1-day-old giant colony of  $\Sigma S^h$  strain (inset, bud scars on mother round cell) or in a 1-month-old colony of  $\Sigma SGH^h$  strain. Bars = 10  $\mu m$ .

strains ( $\Sigma 1278^d$ ,  $PD^d$ ,  $\Sigma SG^d$ ) exhibiting polar budding in liquid medium and markedly structured, faintly structured or smooth colonies, respectively. We picked up cells from different parts of a giant colony (the periphery or the central mound of the colony) and we determined the budding pattern by calcofluor staining. Results are summarized in Table 2A. The ratios of axially, polarly and randomly budding cells in colonies of individual strains significantly differed from those observed in liquid cultures. In colonies of all three haploid strains, a considerable proportion of bipolarly and randomly budding cells was detected. This proportion usually rose more in central parts of the colonies. The bipolarly and randomly budding cells were already found in relatively young, 5-day-old colonies, but their proportions were lower (results not shown). The cells in colonies of all three diploid strains budded predominantly in a polar manner, but in comparison to cells in liquid culture, the proportion of randomly budding cells increased, particularly in the colony center (from 1, 4, and 13% in liquid culture of  $\Sigma 1278^d$ ,  $\Sigma SG^d$  and  $PD^d$ , respectively, to 10, 24, and 36% in the mound of the respective colony; Table 2A). The decreased proportion of axially budding cells was also found in monoclonies (the entire monoclonality was suspended) of the three haploid strains (Table 2A).

### 3.3. Effect of cell–cell aggregation on colony morphology

In contrast to other haploid and diploid strains used in this study that form rather smooth or partially structured colonies, the diploid strain  $\Sigma 1278^d$  and its haploid derivatives  $\Sigma S^h$ ,  $\Sigma SGH^h$ , and  $\Sigma SGHbud2^h$  (see Section 3.4) exhibited distinct behavior. They formed structured fluffy giant colonies and monoclonies (Fig. 2). The cells of these strains ( $\Sigma 1278^d$ ,  $\Sigma S^h$ ,  $\Sigma SGH^h$ , and  $\Sigma SGHbud2^h$ ) formed monoclonies with fringed edges at an early stage of development (20 h of growth) with chains of long cells ( $\Sigma 1278^d$ ), oval-elongated cells (strains  $\Sigma S^h$  and  $\Sigma SGH^h$ ) and round-oval cells ( $\Sigma SGHbud2^h$ ) (Fig. 2). The 6-day-old monoclonies exhibited the same pattern of cell distribution. The cells in colonies occurred in giant aggregates (in which individual

cells could not be distinguished), which could not be disrupted in 0.25 M EDTA. For microscopy observations these aggregates were mechanically broken, which allowed us to observe individual cell clusters (Fig. 2). The budding pattern of cells in clusters appeared to be monopolar ( $\Sigma 1278^d$ ), monopolar and sometimes axial ( $\Sigma S^h$  and  $\Sigma SGH^h$ ) and random ( $\Sigma SGHbud2^h$ ). In monoclonies, likewise in liquid medium or in giant colonies of strains  $\Sigma S^h$  and  $\Sigma SGH^h$ , switching from axial to monopolar budding of the cells in clusters was connected with the change in cell shape from round-oval to elongated (Fig. 3). Monoclonies of the diploid strain  $\Sigma SG^d$  were nearly smooth and composed of round-oval cells exhibiting predominantly bipolar budding. No aggregation and clustering of the cells was observed in this strain (Fig. 2).

Both monoclonies and giant colonies of strains  $\Sigma 1278^d$ ,  $\Sigma S^h$ ,  $\Sigma SGH^h$ , and  $\Sigma SGHbud2^h$  became smooth when incubated on agar medium containing mannose instead of glycerol (Fig. 2). No giant aggregates (Fig. 2) were present and the number of monopolar clusters was significantly decreased. In the  $\Sigma 1278^d$  strain, clusters were not present at all, while in  $\Sigma S^h$  and  $\Sigma SGH^h$  colonies, an increased number of axial cell clusters was observed. In all cases, the cells were less elongated compared to colonies growing on glycerol medium.

The apparent importance of cell–cell aggregation in fluffy colony morphology is also supported by the observation that even giant colonies of four tested haploid parental strains ( $OL^h$ ,  $OB^h$ ,  $15B^h$ ,  $78^h$ ) and corresponding *bud2* disruptants (see Section 3.4) grown at laboratory temperature (22 °C) contained fluffy-like areas (mounds) formed by aggregated cells (Fig. 4). These aggregates differed from the aggregates in the colonies of  $\Sigma 1278^d$  because they could be nearly completely disrupted in 0.25 M EDTA. After disruption, only small cell clusters exhibiting axial, polar or random budding pattern were found. Cell aggregation was also observed in 26-day-old structured monoclonies of haploid strains  $OL^h$ ,  $OB^h$ ,  $15B^h$ ,  $78^h$ ,  $GRF^h$ ,  $P1^h$ , and  $P2^h$  and diploid  $PD^d$  but not in smooth monoclonies of strains  $YPH^h$  and  $KT^h$  (data not shown).

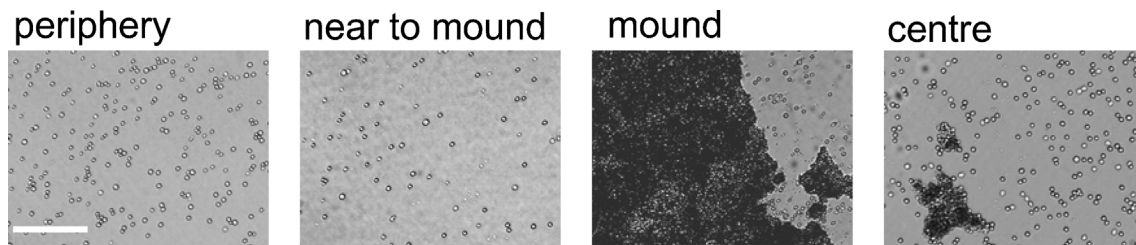


Fig. 4. Surface properties of cells collected from different areas of a 1-month-old giant colony of haploid strain OL<sup>h</sup> growing on GM-agar. Bar = 100  $\mu$ m.

### 3.4. The effect of *BUD2* gene disruption on giant colony morphology

All ten haploid strains with leucine auxotrophy (YPH<sup>h</sup>, OL<sup>h</sup>, OB<sup>h</sup>, 15B<sup>h</sup>, 78<sup>h</sup>, GRF<sup>h</sup>, KT<sup>h</sup>, P1<sup>h</sup>, P2<sup>h</sup>,  $\Sigma$ SGH<sup>h</sup>) were subsequently used for *BUD2* gene disruption. The strains were transformed with a linear DNA fragment containing the *BUD2* gene interrupted by the *LEU2* gene, and leucine prototrophs (possibly defective in *BUD2*) were selected on a medium without leucine. Homozygous *bud2* diploid PD*bud2*<sup>d</sup> was obtained by crossing of the respective haploids P1*bud2*<sup>h</sup> and P2*bud2*<sup>h</sup>. The disruption of the *BUD2* gene was verified by PCR. Calcofluor staining of cells growing in liquid culture revealed that the budding pattern of all haploid *bud2* strains and *bud2/bud2* diploid nearly completely changed to random budding (Table 2B). Random budding of strain  $\Sigma$ SGH*bud2*<sup>h</sup> was verified after the dispersion of cell clusters.

The giant colonies of haploid and diploid *BUD2*-disrupted strains exhibited a slightly simpler morphology than parental strains, with either nearly complete absence or a significant reduction in the number of radial grooves and/or sectors on the colony surface (Fig. 1). Some strains formed more compact, higher colonies with smaller diameter. The fluffy structure of  $\Sigma$ SGH<sup>h</sup> giant colonies was only partially affected by disruption of the *BUD2* gene, i.e., the  $\Sigma$ SGH*bud2*<sup>h</sup> strain formed slightly less fluffy giant colonies (Fig. 2).

Morphology variations in monoclonies of individual strains plated at a density of 100–140 colonies per plate are shown in Fig. 1. As predicted, no effect of *BUD2* gene disruption was observed on monoclonies of the strain YPH*bud2*<sup>h</sup> which formed nearly smooth colonies similarly to parental strain YPH<sup>h</sup>. The colony morphology of the other three strains (OB*bud2*<sup>h</sup>, GRF*bud2*<sup>h</sup>, KT*bud2*<sup>h</sup>) was apparently not affected by the change in the budding pattern. In contrast, six strains (OL*bud2*<sup>h</sup>, 15B*bud2*<sup>h</sup>, 78*bud2*<sup>h</sup>, P1*bud2*<sup>h</sup>, P2*bud2*<sup>h</sup>, and PD*bud2*<sup>d</sup>) formed smoother colonies in comparison with parental *BUD2* strains (Fig. 1). In contrast to parental strain  $\Sigma$ SGH<sup>h</sup>, randomly budding strain  $\Sigma$ SGH*bud2*<sup>h</sup> formed taller and less fluffy monoclonies at the onset of growth (20 h) and also later (6 days; Fig. 2).

In addition, disruption of the *BUD2* gene affected adhesion of haploid cells to agar surfaces and their invasive growth in agar. Two haploid parental strains (KT<sup>h</sup>, GRF<sup>h</sup>) with randomly and polarly budding cells exhibited moder-

ate invasive growth, while haploid axially budding parental strains (YPH<sup>h</sup>, OL<sup>h</sup>, OB<sup>h</sup>, 15B<sup>h</sup>) (Table 1) did not invade the agar at all. Strain 78<sup>h</sup> weakly invaded agar medium only after prolonged cultivation. All seven randomly budding strains with the interrupted *BUD2* gene invaded agar medium, some of them more efficiently than parental strains KT<sup>h</sup> and GRF<sup>h</sup> (Fig. 1). The cell clumps observed in agar contained nearly round cells, while pseudohyphal cell chains were not observed. We presume that the observed invasiveness is connected with the propensity of random or polar budding strains to form short cell chains that are not formed by axially budding cells. Accordingly, parental strains KT<sup>h</sup> and GRF<sup>h</sup> forming a higher fraction of randomly budding cells invade agar more efficiently. As described [27], the invasive growth of haploid strains derived from the  $\Sigma$ 1278<sup>d</sup> strain depends on their switching from axial to monopolar budding. Axial budding appears not to allow invasive growth.

## 4. Discussion

### 4.1. Budding of cells in colonies

Initial information concerning differences in the mode of budding of haploid and diploid *S. cerevisiae* cells, and subsequent information relating to rules influencing axial and polar budding patterns, were obtained with haploid and diploid cells exponentially growing in liquid cultures [6,12,31]. However, little is known about the budding of cells growing within multicellular colonies on solid medium, nor about their ability to change their budding pattern during colony development. Our results obtained with several haploid and diploid strains with different genetic backgrounds show that the budding pattern of cells within the colony is not uniform. In colonies formed by haploid strains, which, in liquid exponential culture, bud almost exclusively axially, a high portion of cells budding either in a bipolar manner or randomly was observed. These polar and randomly budding cells were already present in relatively young colonies (5-days-old); however, their proportion significantly increased in older colonies, particularly in the mound area. Also, in colonies of diploid strains, which bud in a polar fashion in liquid cultures, a relatively high number of randomly budding cells were present in the mound part of their colonies (Table 2A). Since cells containing only several buds were evaluated in

these experiments, the observed difference in the budding pattern was not simply the result of replicative aging of individual cells, but rather reflected different nutritional conditions, and therefore different chronological cell aging, in different colony areas. The effect of starvation on the manner of budding is known in liquid culture, where starving haploid cells convert from an axial to a bipolar budding pattern at the onset of budding after addition of nutrients [18]. Conversely, bipolar budding of diploid cells in liquid medium is not affected by previous starvation [13]. These results indicate that the axial budding tags are less stable and might be relocated when the cell cycle duration is extended. As indicated below, cells in different parts of a colony can differentially undergo starvation, which may affect their budding pattern. The presence of a higher proportion of polarly budding cells than of those budding randomly (Table 2A) supports the hypothesis of a relatively frequent axial to polar change in budding in colonies as well.

#### 4.2. Density of plating affects colony morphology

The morphology of colonies changes during colony aging and is influenced by the density of colonies on the plate. When monitoring the development of monoclonal colonies over an interval of one month, older colonies exhibited more structured morphology and contained a higher number of non-axially budding cells than young monoclonal colonies. This may reflect more efficient differentiation of cells in different areas of aged colonies evoked by imminent nutrient depletion. The different expression patterns of several genes in distinct colony areas have been described previously [20]. When monoclonal colonies are plated at higher densities, their “internal” development is speeded up and the length of individual developmental steps shortened (they persist in a particular growth phase for a shorter time). Hence, they may reach the “structured” phase earlier than solitary colonies having more nutrient resources. Moreover, the development of neighboring colonies is synchronized either by volatile ammonia [21] or by yet unknown mechanisms, as apparent from the synchronized expression of the *LacZ* marker gene from some yeast promoters [20]. These findings are in agreement with our observation that the morphology of all monoclonal colonies of the respective strain plated with the same density was the same.

#### 4.3. The effect of *BUD2* gene disruption

The disruption of the *BUD2* gene leading to uniform random budding in liquid cultures, in most cases, influenced the morphology of giant colonies and in several cases also that of the monoclonal colonies. Despite the fact that the overall effect of disruption was relatively weak, the smoother morphology of the colonies is apparent (Fig. 1). The formation of smoother colonies could reflect perturbation of organized budding or the absence of budding pattern variations in distinct colony areas. Relatively smoother morphology of giant

colonies of the parental strains GRF<sup>h</sup> and KT<sup>h</sup>, containing a high proportion of randomly budding cells in comparison with colonies of other parental strains, is in agreement. The results confirm the impact of a polarized manner of budding on the morphology of both *S. cerevisiae* giant colonies and monoclonal colonies.

#### 4.4. The effect of cell aggregation

In contrast to the relatively weak effect of *BUD2* gene disruption, cell aggregation markedly influences colony morphology. Diploid strain  $\Sigma 1278^d$  and derived haploids  $\Sigma S^h$ ,  $\Sigma SGH^h$ , and  $\Sigma SGHbud2^h$  created structured fluffy colonies containing giant cell aggregates (Fig. 2). No such cell aggregates were found in smooth colonies of either the  $\Sigma 1278^d$ -derived strains growing on agar medium with mannose or of the diploid strain  $\Sigma SG^d$  (Fig. 2). Contrary to this diploid strain, cells of which exhibited a predominantly bipolar budding pattern and individual cells of which were separated, budding of other  $\Sigma 1278^d$ ,  $\Sigma S^h$ , and  $\Sigma SGH^h$  cells was mostly monopolar, cells did not separate and created clusters and aggregates. Thus, the prerequisite to formation of giant aggregates within fluffy colonies appears to be the presence of large cell clusters formed by monopolarly (eventually randomly, strain  $\Sigma SGBud2^h$ ) budding cells. A monopolar budding pattern and prolonged cell shape may allow effective extension of the clusters. Also, the round-shaped cells budding randomly ( $\Sigma SGHbud2^h$ ) were able to form filament-like clusters. Since these filaments were not linear, the clusters as well as the whole colony were more compact with a reduced airy appearance (Fig. 2). Round cells budding in an axial manner ( $\Sigma S^h$  and  $\Sigma SGH^h$  growing on agar with mannose) formed only small clumps (Fig. 2), significantly differing from clusters described above. Thus, axial budding appears to be inconsistent with formation of the filaments and giant aggregates and resulting colonies are smooth.

The cells in giant aggregates and possibly also in clusters appear to be connected by an extracellular matrix. Recent data supporting the importance of the extracellular matrix connecting the cells and promoting aggregate formation come from studies of the *S. cerevisiae* BR-fluffy strain isolated from nature [16]. This strain creates fluffy colonies producing abundant extracellular matrix non-related to standard  $Ca^{2+}$ -dependent flocculins. Domestication of this strain under laboratory conditions is accompanied by the loss of extracellular matrix and formation of smooth colonies. A similar phenomenon was described in *Candida albicans*, where colony morphology variant CAL4, which forms smooth colonies and is unable to form pseudohyphae, has a reduced quantity of non-covalently linked cell wall proteins [14]. The behavior of strain  $\Sigma 1278^d$  appears to be influenced by Flo11p (encoded by the *FLO11* gene), a member of a large family of cell surface glycoproteins involved in cell adherence [17]. Flo11p is required for filamentous growth, invasive growth, attachment to the plastic surface or formation of

“mats”, complex structures formed on soft agar [26]. Transcription of *FLO11* decreases with increasing cell ploidy [17] and appears to be repressed in strains with expression of the *STA10* gene, which is present in many laboratory *S. cerevisiae* strains [24]. The fluffy colony morphology of  $\Sigma 1278^d$ -derived strains was less prominent in the direction from haploids  $\Sigma SG^h$  and  $\Sigma S^h$ , through diploid  $\Sigma 1278^d$  (developed fluffy structures later) to diploid  $\Sigma SG^d$  (formed smooth colonies). This could correspond to the presence of the Flo11p protein in haploids and to the repression of its gene in  $a/\alpha$  diploids. In the diploid  $\Sigma SG^d$  forming smooth colonies, transcription of the *FLO11* gene may also be repressed by the Sta10p regulator produced from the genome of laboratory strain GRF<sup>h</sup>. Thus, Flo11p may be involved in formation of cell clusters and aggregates in fluffy  $\Sigma 1278^d$ -derived colonies. Monopolar budding, important for the extension of cell clusters, may be related to metastable expression of the *FLO11* gene. As was shown recently, when *FLO11* is expressed, diploid cells form pseudohyphal filaments, while when *FLO11* is silent, the cells grow in a yeast form [11].

The absence of giant cell aggregates accompanied by a decreased proportion of monopolar clusters and by the presence of less elongated cells in colonies growing on agar with mannose (Fig. 2) probably does not simply reflect an inhibitory effect of mannose on cell–cell flocculation observed in liquid cell suspensions [30]. Guo et al. [10] reported that when the *FLO11* gene is overexpressed, flocculation of  $\Sigma 1278$  cells in liquid medium is not inhibited by the presence of mannose. Factors influencing the intensity of *FLO11* expression in cells growing on agar are not yet known. Our results suggest that the presence of mannose in agar may inhibit expression of the *FLO11* gene, which results in lower intensity of monopolar budding and decreased formation of cell clusters and aggregates.

Also, the other tested strains were able to form cell aggregates (Fig. 4). These aggregates were present in the fluffy mounds of aged giant colonies and also in old monoclonal colonies of nearly all haploid strains. The relationship between the yeast's ability to aggregate and fluffy colony structure is also supported by the finding that no aggregates were present in the smooth areas of giant colonies nor in smooth monoclonal colonies of strains YPH<sup>h</sup> and KT<sup>h</sup> (Fig. 1). The cell aggregation found in most haploid strains is different from that found in  $\Sigma 1278^d$ -derived strains. It may be connected with production of  $Ca^{2+}$ -dependent flocculins, because washing with EDTA leads to aggregate dissociation [30]. The *FLO* genes of this family (*FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10*) have a subtelomeric location and therefore they can be repressed by heterochromatin [4]. They appear not to be commonly expressed in laboratory strains. However, recently it was shown that one of this genes, the silent *FLO10* gene, is activated by high-frequency loss-of-function mutations and that its silencing is metastable and switches back and forth frequently [4,11]. Thus, in the old cells, the silencing of the *FLO* genes may be released, and they could become re-

sponsible for changed characteristics of the surface of aged colonies. This could explain the formation of cell aggregates and fluffy structures in the aged parts of colonies.

## Acknowledgements

We thank V. Závada and K. Sigler for critical reading of the manuscript, F. Cvrčková and M. Schierová for helpful advice, and D. Maišaidrová for technical assistance. This work was supported by grants from the Grant Agency of the Academy of Sciences IAA 500200506, GA UK 267-2004, the Ministry of Education of the Czech Republic LC531 and EMBO-YIP to Z.P.

## References

- [1] A. Bender, J.R. Pringle, Multicopy suppression of the Cdc24 budding defect in yeast by Cdc42 and 3 newly identified genes including the ras-related gene Rsr1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 9976–9980.
- [2] D. Cavalieri, J. Townsend, M. Polsinelli, D. Hartl, Whole genome expression analysis of colony morphology in vineyard isolates of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 18 (2001) S110.
- [3] F. Cvrčková, K. Nasmyth, Yeast G(1) cyclins Cln1 and Cln2 and a gap-like protein have a role in bud formation, *EMBO J.* 12 (1993) 5277–5286.
- [4] G. Fink, Fungi and the immune system: When worlds collide, *Yeast* 20 (2003) S11.
- [5] H. Flegelová, D. Novotná, K. Vojtková, B. Janderová, Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with a different degree of resistance to killer toxins K1 and K2, *FEMS Yeast Res.* 2 (2002) 73–79.
- [6] D. Freifelder, Bud position in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* 80 (1960) 567–568.
- [7] R.D. Gietz, R.H. Schiestl, A.R. Willems, R.A. Woods, Studies on the transformation of intact yeast-cells by the Liac/S-DNA/Peg procedure, *Yeast* 11 (1995) 355–360.
- [8] A.P.R. Gil, Z. Storchová, V. Vondřejis, Uracilless death and papillae formation in rad6-1 polyauxotrophic strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Folia Microbiol.* 42 (1997) 557–561.
- [9] C.J. Gimeno, P.O. Ljungdahl, C.A. Styles, G.R. Fink, Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS, *Cell* 68 (1992) 1077–1090.
- [10] B. Guo, C.A. Styles, Q. Feng, G.R. Fink, A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell–cell adhesion, and mating, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 12158–12163.
- [11] A. Halme, S. Bumgarner, C. Styles, G.R. Fink, Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast, *Cell* 116 (2004) 405–415.
- [12] J. Chant, I. Herskowitz, Genetic-control of bud site selection in yeast by a set of gene-products that constitute a morphogenetic pathway, *Cell* 65 (1991) 1203–1212.
- [13] J. Chant, J.R. Pringle, Patterns of bud-site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Cell. Biol.* 129 (1995) 751–765.
- [14] M. Iranzo, J.V. Canizares, I. Sainz-Pardo, C. Aguado, J. Ponton, S. Mormeneo, Isolation and characterization of an avirulent *Candida albicans* yeast monomorphic mutant, *Med. Mycol.* 41 (2003) 43–52.
- [15] A. Kockova-Kratochvílová, *Yeasts and Yeast-Like Organisms*, VCH Publishers, Weinheim, 1990.
- [16] M. Kuthan, F. Devaux, B. Janderová, I. Slaninová, C. Jacq, Z. Palková, Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by



- changes in gene expression and colony morphology, *Mol. Microbiol.* 47 (2003) 745–754.
- [17] W.S. Lo, A.M. Dranginis, *FLO11*, a yeast gene related to the *STA* genes, encodes a novel cell surface flocculin, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 7144–7151.
- [18] K. Madden, M. Snyder, Specification of sites for polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae* and the influence of external factors on site selection, *Mol. Biol. Cell* 3 (1992) 1025–1035.
- [19] A. Maráz, L. Ferenczy, in: J.F. Peberdy (Ed.), *Protoplast Application in Microbial Genetics*, Univ. of Nottingham, 1979, pp. 35–45.
- [20] L. Minarikova, M. Kuthan, M. Ricicova, J. Forstova, Z. Palková, Differentiated gene expression in cells within yeast colonies, *Exp. Cell Res.* 271 (2001) 296–304.
- [21] Z. Palková, J. Forstova, Yeast colonies synchronize their growth and development, *J. Cell Sci.* 113 (2000) 1923–1928.
- [22] Z. Palková, B. Janderová, J. Gabriel, B. Zikanova, M. Pospisek, J. Forstova, Ammonia mediates communication between yeast colonies, *Nature* 390 (1997) 532–536.
- [23] H.O. Park, J. Chant, I. Herskowitz, Bud2 encodes a GTPase-activating protein for Bud1/Rsr1 necessary for proper bud-site selection in yeast, *Nature* 365 (1993) 269–274.
- [24] J. Polaina, M.Y. Wiggs, *Sta10*—a gene involved in the control of starch utilization by *Saccharomyces*, *Curr. Genet.* 7 (1983) 109–112.
- [25] D.R. Radford, S.J. Challacombe, J.D. Walter, A scanning electronmicroscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of *Candida albicans*, *J. Med. Microbiol.* 40 (1994) 416–423.
- [26] T.B. Reynolds, G.R. Fink, Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation, *Science* 291 (2001) 878–881.
- [27] R.L. Roberts, G.R. Fink, Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: Mating and invasive growth, *Genes Dev.* 8 (1994) 2974–2985.
- [28] R.J. Rothstein, One-gene disruption in yeast, in: R. Wu, L. Grossman, K. Moldave (Eds.), *Methods of Enzymology*, 1983, pp. 202–211.
- [29] R.S. Sikorski, P. Hieter, A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 122 (1989) 19–27.
- [30] M. Stratford, H.P. Coleman, M.H. Keenan, Yeast flocculation: A dynamic equilibrium, *Yeast* 4 (1988) 199–208.
- [31] E. Streiblova, Study of scar formation in the life cycle of heterothallic *Saccharomyces cerevisiae*, *Can. J. Microbiol.* 16 (1970) 827–831.
- [32] M. Varon, M. Choder, Organization and cell–cell interaction in starved *Saccharomyces cerevisiae* colonies, *J. Bacteriol.* 182 (2000) 3877–3880.
- [33] D.K. Whittaker, D.B. Drucker, Scanning electron microscopy of intact colonies of microorganisms, *J. Bacteriol.* 104 (1970) 902–909.
- [34] Z. Zheng, A. Bender, R.A. Cerione, Interactions among proteins involved in bud-site selection and bud-site assembly in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 626–630.

# Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture

Irena Vopálenská,<sup>1†</sup> Vratislav Št'oviček,<sup>1†</sup>  
Blanka Janderová,<sup>1</sup> Libuše Váchová<sup>2,1</sup> and  
Zdena Palková<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic.

<sup>2</sup>Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic.

## Summary

Microbial populations in nature often form organized multicellular structures (biofilms, colonies) occupying different surfaces including host tissues and medical devices. How yeast cells within such populations cooperate and how their dimorphic switch to filamentous growth is regulated are therefore important questions. Studying population development, we discovered that *Saccharomyces cerevisiae* microcolonies early after their origination from one cell successfully occupy the territory via dimorphic transition, which is induced by ammonia and other volatile amines independently on cell ploidy and nutrients. It results in oriented pseudohyphal cell expansion in the direction of ammonia source, which consequently leads to unification of adjacent microcolonies to one more numerous entity. The further population development is accompanied by another dimorphic switch, which is strictly dependent on Flo11p adhesin and is indispensable for proper formation of biofilm-like aerial 3-D colony architecture. In this, Flo11p is required for both elongation of cells organized to radial clusters (formed earlier within the colony) and their subsequent pseudohyphal expansion. Just before this expansion, Flo11p relocates from the bud-neck of radial cell clusters also to the tip of elongated cells.

## Introduction

Microorganisms growing in natural conditions usually form multicellular structures, which are highly organized and exhibit specific properties which do not arise under laboratory conditions (Palkova and Vachova, 2006). Examples are complicated biofilms causing serious problems in medical care because of their adhesion to different materials and high resistance against the chemical treatment. Multicellular colonies are another example of structures which are common in nature. Cooperation of yeast cells and their growth within a community is beneficial in harmful natural environment and might also contribute to successful colonization of the host tissue and effective struggle with the host immune response.

In spite of the fact that exact mechanisms involved remain largely unknown, three yeast capabilities are of a great significance in a community organization, development and survival. These are yeast dimorphic transition, adhesion to solid surfaces and cell–cell communication. Dimorphic transition to pseudohyphal/hyphal form was clearly documented in different yeast species including *C. albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* (Gancedo, 2001; Sudbery *et al.*, 2004). It was shown to be important for *C. albicans* biofilm maturation and colony formation (Radford *et al.*, 1994) and for successful *S. cerevisiae* biofilm adhesion (Reynolds and Fink, 2001). Yeast cell ability to adhere other cells and solid surfaces is connected with production of extracellular matrix and various adhesins (e.g. *S. cerevisiae* FLO, *C. albicans* ALS, *C. glabrata* EPA families) (Dranginis *et al.*, 2007). The structure of these extracellular proteins is somewhat similar, sharing the key structural elements including N-terminal domain important for specific adherence, extensively glycosylated central domain rich in Ser/Thr and C-terminal hydrophobic signal directing the GPI anchor addition. In contrast to some natural *S. cerevisiae* strains, Flo11p is not produced by most of the laboratory strains, probably due to a mutation in the gene of one of its regulators, *FLO8* (Liu *et al.*, 1996). *FLO11* gene is important for both the formation of pseudohyphae in diploids and invasive growth of haploids during nitrogen and glucose limitation (Lo and Dranginis, 1998), for adhesion to plastic and the formation of mats and biofilms (Reynolds and Fink, 2001).

Successful occupation of a niche and survival under particular conditions is also dependent on ability

Received 12 May, 2009; accepted 11 August, 2009. \*For correspondence. E-mail: zdenap@natur.cuni.cz; Tel. (+420) 221951721; Fax (+420) 221951724. †These authors contributed equally to the work.

of microbial populations to communicate via different chemical signals, often functioning as quorum sensing molecules inducing coordinated cell behaviour. These molecules participate in formation of antimicrobials resistant biofilms causing infections either by attaching to plastic material or directly to tissues (Douglas, 2003; Juhas *et al.*, 2005; Keller and Surette, 2006). Two signalling compounds farnesol and tyrosol influencing filamentation in opposite way are important in cell density sensing, dimorphic transitions and biofilm formation by *C. albicans* (Alem *et al.*, 2006; Nickerson *et al.*, 2006; Kruppa, 2009). A high-cell-density-induced morphogenetic switch controlled by signalling via the aromatic alcohols phenylethanol and tryptophol was recently described in *S. cerevisiae* (Chen and Fink, 2006). Furthermore, volatile ammonia is important signalling molecule in ageing colonies of various yeasts (Palkova *et al.*, 1997) where it is connected with metabolic reprogramming and adaptation of the population to incoming nutrient shortage (Palkova *et al.*, 2002; Vachova *et al.*, 2009).

In contrast to most other laboratory strains, *S. cerevisiae*  $\Sigma 1278$  (and its derivatives) is capable of dimorphic transition and filamentous growth under nitrogen starvation (Gimeno *et al.*, 1992). It can also bind to solid surfaces via Flo11p surface adhesin forming a biofilm-like structure (Reynolds and Fink, 2001). This, together with the fact that this strain is able to perform sexual cycle including production of viable spores (this ability is often limited in *S. cerevisiae* natural isolates), makes the strain  $\Sigma 1278$  very useful tool for studies of processes mentioned above, and allows also to explore differences potentially caused by different mating type.

Here, we show that *S. cerevisiae* is capable of two differently regulated dimorphic transitions from yeast to multicellular filamentous form, having distinct roles during development of yeast population. The first one is induced by volatile ammonia (or other volatile amines) and results in oriented cell growth and joining of adjacent microcolonies. It is independent of cell ploidy, nutrients and presence of yeast surface flocculin Flo11p. The second one, which occurs at the moment when young smooth microcolonies change character of their growth and start to

form aerial structure, is dependent on the Flo11p and it is essential for the formation of three dimensional aerial colony architecture.

## Results

### *Yeast cell switch from axial to unipolar growth depends on young microcolony density, but not on the nutrients*

To obtain an overview on the early organization of *S. cerevisiae* population, we plated the haploid strain  $\Sigma S^h$  on complex glycerol medium (GMA-BKP) as 5  $\mu$ l drops containing various cell numbers (C5–C50000, Table 1 and Fig. S1). For plating, we used a culture of exponentially growing  $\Sigma S^h$  cells in YPD medium, which contained mostly small clusters of 3–8 axially budding cells (non-separated mother–daughter cells), but also some primary axial clusters possessing elongated unipolarly budding cells.

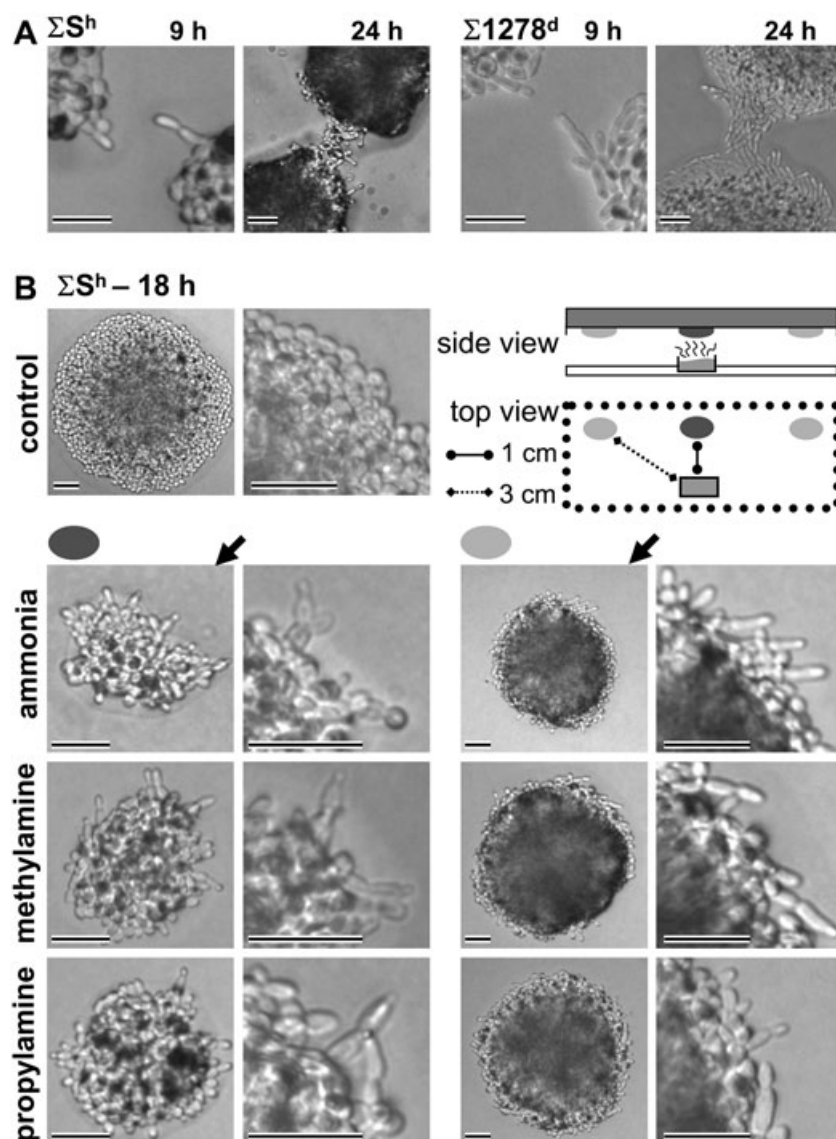
The development of solitary microcolonies (plating C5) was always similar and independent of whether axially or unipolarly budding cell clusters were originally plated. On the agar, both formed new generations of oval axially budding cells and continued axial budding at the edge of the microcolony for at least 48 h (Fig. S1). At higher plating densities, peripheral cells of microcolonies were able to undergo dimorphic transition, switching from rounded axially budding cells to prolonged unipolarly budding cells, depending on the distance between the growing microcolonies (Table 1, Fig. S1). At densities C50000 and C5000, peripheral cells switched as early as 4 h after the inoculation and grew in all directions out of the colony. In contrast, peripheral cells of microcolonies in sparse plating (C50) switched only 24 h after the inoculation and only the cells located at the margin adjacent to the neighbouring colony(ies) were able to switch. This, specifically localized, unipolar cell-budding resulted in oriented growth of peripheral cells preferentially towards adjacent microcolony (Fig. 1A). Averaging from three independent experiments and evaluating at least 200 colonies in each,  $78 \pm 2\%$  of all unipolarly budding cells (or cell-chains) at colony peripheries were markedly oriented in the direction towards the neighbouring colony.

**Table 1.** How the timing of dimorphic transition and medium alkalization varies with colony density.

Density of the plating	Number of cells per 5 $\mu$ l drop	Timing of switch to unipolar budding (h)	Visible alkalization of the medium (h)	Initiation of the formation of aerial structure (h)
C5	1–5	48 (at least)	36–48 <sup>a</sup>	72
C50	30–50	24	36–48 <sup>a</sup>	55–72
C500	300–500	4–9	30 <sup>b</sup>	50–60
C5000	3 000–5 000	4	20 <sup>b</sup>	36
C50000	30 000–50 000	4	11 <sup>b</sup>	24

a. Weak alkalization below the microcolony.

b. Intensive alkalization below and also around the microcolony.



**Fig. 1.** Polarized growth of  $\Sigma S^h$  and  $\Sigma 1278^d$  cells located at colony periphery, effect of ammonia and other amines.

A. Polarized growth of cells located at margins of  $\Sigma S^h$  and  $\Sigma 1278^d$  microcolonies towards adjacent colony. Bar, 20  $\mu m$ .

B. Development of  $\Sigma S^h$  solitary microcolonies on GMA affected by volatile ammonia, methylamine or propylamine. Control solitary microcolony growing on GMA is given for comparison. Upper right, scheme of the experimental set-up. Colonies affected by higher amine concentration denoted by dark-grey discs and those affected by lower amine concentration by light-grey discs. Black arrow indicates amine gradient orientation. Bar, 20  $\mu m$ .

The timing of the dimorphic switch and development of microcolonies during the first 24 h of cultivation was independent of nutrients, which were available in surplus in the plate. Thus, as expected, development was identical when microcolonies were grown on either 1.5 mm or 3.5 mm layers of the agar medium with either 0.5% or 3% glycerol concentrations (data not shown).

#### *Ammonia induces first dimorphic transition leading to oriented growth of neighbouring microcolonies*

The obtained data indicated an intriguing possibility, that the dimorphic transition could be a result of a form of signalling between young microcolonies. This, together with our knowledge of the weak release of ammonia detected early after giant colony inoculation (Palkova *et al.*, 1997), led us to analyse the possibility of ammonia

being involved in this early intermicrocolony communication and in the merging of microcolonies.

Monitoring of pH changes occurring during the development of microcolonies plated on GMA-BKP revealed alkalinization, the timing of which was also dependent on microcolony density (Table 1). With C50000, C5000 and C500 plating, intensive alkalinization of the medium among the microcolonies was observed when the colonies had already approached each other and exhibited intensive unipolar growth (i.e. after 11, 20 and 30 h of growth respectively). With sparse plating (C50 and C5) only weak alkalinization appeared under individual microcolonies after 36–48 h (Table 1).

An important question was whether an ammonia production preceded the dimorphic transition and could be involved in the induction of oriented filamentous growth or, alternatively, only unipolarly budding cells started to

produce ammonia, which consequently alkalinized the colony surroundings. Hence, we shortly exposed sparsely plated  $\Sigma S^h$  cells to various amounts of volatile ammonia vapour. After 17–18 h, the cells of solitary microcolonies originating from ammonia-affected cells exhibited efficient unipolar budding. The efficiency of the transition was dependent on the ammonia dosage (Fig. 1B). Colonies exposed to the higher ammonia concentration were smaller in their diameter than control microcolonies growing from nonaffected cells, and contained a lot of elongated unipolarly budding cells, some of those even in central colony regions. In contrast, the solitary microcolonies exposed to lower ammonia concentrations did not exhibit a growth reduction and contained elongated unipolarly budding cells mostly at the periphery and usually facing to the ammonia source. Control colonies were always large, flat and symmetrical with smooth margins and did not contain elongated unipolarly budding cells (Fig. 1B).

As proposed previously the action of ammonia on amoebas of *Dictyostelium discoideum* could be connected with its ability to penetrate through the plasma membrane and to influence the pH of internal compartments. This could consequently be registered by cells as a signal leading to changes in cell behaviour. This hypothesis was mostly based on the finding that the effect of ammonia on *D. discoideum* development can also be elicited by other volatile amines (Davies *et al.*, 1993). To explore the possibility of a similar ammonia action on yeast microcolonies, we exposed sparsely plated  $\Sigma S^h$  cells to the vapours of various amines and followed the efficiency of the dimorphic switch, comparing it with the induction by ammonia. Besides ammonia, which was the most potent inducer, methylamine and propylamine were able to induce the formation of unipolarly budding cells expanding from microcolonies (Fig. 1B). As with ammonia, the effect of both other amines was also dosage-dependent. In some cases we observed the polarized formation of unipolarly budding cells expanding in the direction of the amine source, thus simulating a neighbouring colony (Fig. 1B). In addition, some effect of ammonia on cell growth was observed also in liquid  $\Sigma S^h$  culture. Here, increased level of ammonia (but not of ammonium) induced formation of branched cell-chains (Fig. S2).

Finally, to determine whether ammonium and/or pH can influence the transition, we analysed the growth and budding pattern of solitary  $\Sigma S^h$  microcolonies (C5) on GMA-BKP with either the pH adjusted to 5.5 or 6.5, or with a higher  $NH_4^+$  concentration. Both microcolonies growing at pH 6.5, or on 75 mM  $(NH_4)_2SO_4$  developed unipolarly budding cells earlier than control microcolonies (Fig. 2A) and their growth was partially inhibited. The effect of ammonium supplementation was stronger and led to an

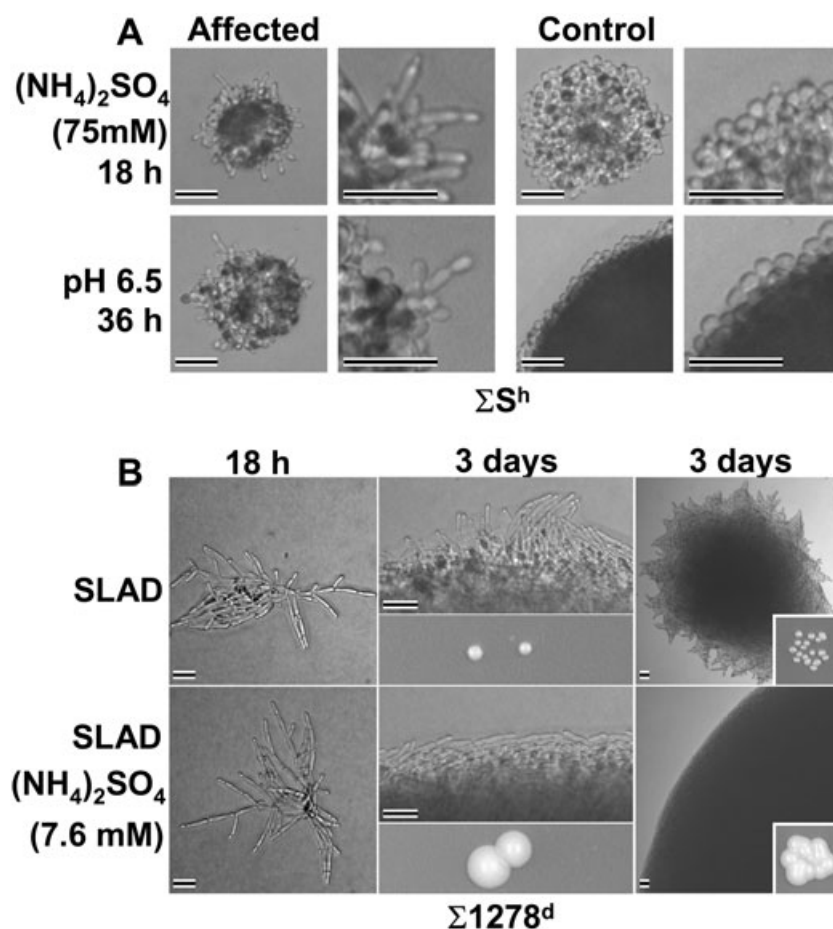
earlier dimorphic transition (18 h after the inoculation) than the effect of adjusting the medium to a higher pH (36 h after the inoculation).

Oriented filamentous growth and the effect of ammonia (and of other volatile amines), ammonium and pH on the dimorphic transition in young microcolonies were not restricted to the haploid  $\Sigma S^h$  strain; we obtained similar results with the diploid  $\Sigma 1278^d$  strain (Fig. 1A, Figs S3 and S4A). The observed difference between the  $\Sigma S^h$  and  $\Sigma 1278^d$  strains was mostly in terms of the morphology of the cells and unipolarly budding filaments, but not of the process of initiating their formation. As also described previously (Roberts and Fink, 1994), the cells and pseudohyphae of  $\Sigma 1278^d$  were always longer and more branched than the elongated cells and filaments of  $\Sigma S^h$ . It also disabled to distinguish possible effect of ammonia on  $\Sigma 1278^d$  pseudohyphae in liquid culture (data not shown).

#### *Early dimorphic transition of young microcolonies growing on SLAD medium is stimulated by increased ammonium level*

As shown above, a higher concentration of ammonium in GMA-BKP effectively potentiated the early switch of both  $\Sigma S^h$  haploid and  $\Sigma 1278^d$  diploid strains to unipolar growth and pseudohyphae formation. In contrast, Gimeno and colleagues (1992) showed that diploid  $\Sigma 1278$ -derived cells switch to pseudohyphal growth (leading to the radial expansion of cells from the colonies in all directions) when growing on low ammonium glucose SLAD medium (synthetic dextrose medium with 0.05 mM ammonium sulfate). On the other hand, colonies growing on SLAD in the presence of the standard level of ammonium [7.6 mM  $(NH_4)_2SO_4$ ] had smooth margins without pseudohyphae (Gimeno *et al.*, 1992). To find out whether this discrepancy was caused by the different cultivation conditions (complex glycerol GMA versus SLAD glucose minimal medium) or, more interestingly, by the different physiology of cells occurring in different growth phases, we compared the effect of various concentrations of  $(NH_4)_2SO_4$  added to SLAD agar on the early dimorphic transition. In both  $\Sigma 1278^d$  and  $\Sigma S^h$  strains, the addition of  $(NH_4)_2SO_4$  to concentrations of 7.6 mM, 37.9 mM or 75.7 mM did not prevent the early switch to pseudohyphal growth (Fig. 2B, Figs S4B and S5A). In fact,  $\Sigma 1278^d$  pseudohyphal growth was very pronounced on SLAD agar with 7.6 mM ammonium sulfate, where pseudohyphae were formed as early as 18 h after the inoculation of a solitary microcolony (Fig. 2B). At higher  $(NH_4)_2SO_4$  concentrations (37.9 mM and 75.7 mM) in SLAD, the  $\Sigma 1278^d$  microcolonies formed long branched pseudohyphae (data not shown).  $\Sigma S^h$  formed elongated unipolarly budding cells with the same pattern (data not shown). These data fully agreed with our observations on the early dimorphic transition on glycerol





**Fig. 2.** Effect of ammonium and pH on development of young solitary microcolonies. A. Development of  $\Sigma S^h$  solitary microcolonies on GMA affected either by higher ammonium sulfate concentration in or higher pH of GMA. Control solitary microcolonies growing on GMA are given for comparison. B. Development of  $\Sigma 1278^d$  solitary microcolonies on SLAD agar with (bottom row) or without (upper row) 7.6 mM ammonium sulfate. Bar, 20  $\mu\text{m}$ .

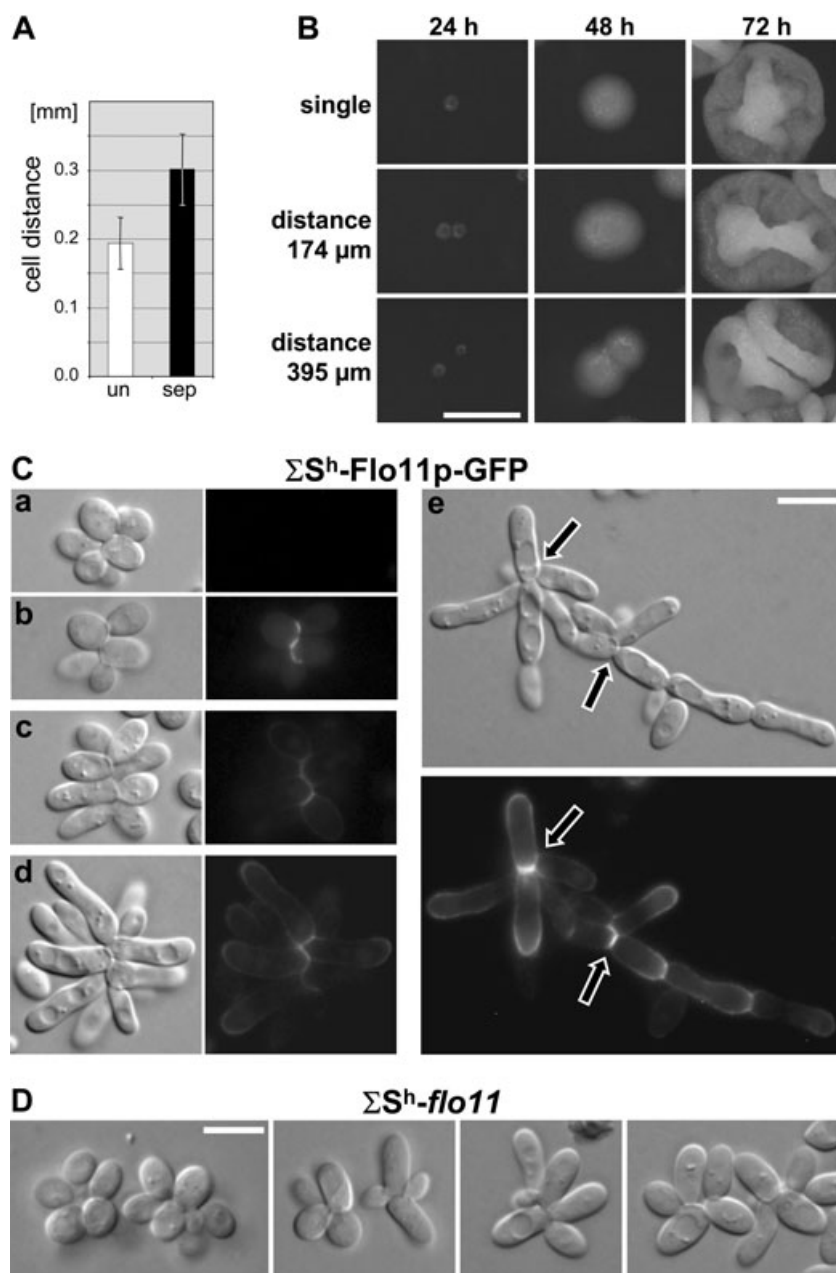
GMA-BKP and proved that also on glucose SLAD agar with a standard level of ammonium [7.6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ], the cells of microcolonies undergo the early dimorphic transition to unipolar growth with high efficiency. The development of older colonies on SLAD and SLAD with 7.6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Fig. 2B and 3-day-old colonies) corresponded to previous observations (Gimeno *et al.*, 1992), thus confirming identical strain behaviour under the growth conditions used.  $\Sigma 1278^d$  pseudohyphal growth in liquid SLAD was not affected by changes in ammonium level (Fig. S5B).

*Second dimorphic transition occurs during development of wrinkled aerial structures*

Both solitary-developing microcolonies and microcolonies within a group (performing ammonia-induced dimorphic transition of margin cells, see above) were smooth until the time when the first wrinkled aerial structures started to appear (Fig. 3B, Video S1). The exact timing of wrinkle appearance was dependent on microcolony density, i.e. densely plated microcolonies formed wrinkles earlier than solitary microcolonies (Table 1).

The formation of wrinkles was accompanied by second dimorphic transition as shown in Fig. 3C. The smooth  $\Sigma S^h$  microcolonies were composed of rounded and elongated cells organized to small radial clusters (Fig. 3C, a–c). Later the number of elongated cells increased; however, they remained attached in the radial clusters (Fig. 3C, d). In contrast to elongated cells and pseudohyphae induced by ammonia, which were mostly localized at colony margin, these clustered cells were spread throughout the smooth colony. At the time just before wrinkle formation, new cells growing unipolarly out of the clusters appeared and were able to develop to relatively long pseudohyphae (Fig. 3C, e). This process appeared independently of microcolony density, thus suggesting that the ammonia-induced early dimorphic transition of peripheral cells was not a prerequisite of wrinkle formation. However, as shown below, early dimorphic transition influenced the structure of giant fluffy colony developing from joined microcolonies.

A cursory glance at structured  $\Sigma S^h$  fluffy giant colony developed by joining of a group of microcolonies did not show any precise wrinkle organization. However, when following the process of microcolony joining and wrinkle



**Fig. 3.** Development of aerial structure depends on second dimorphic transition and Flo11p.

**A.** Maximal distance between inoculated cells leading to formation of unified colonies (un) and minimal distance between inoculated cells, which develop to separated colonies (sep).

**B.** Development of wrinkles on the border of solitary microcolony, on unified microcolony originated from two cells 174 µm distant and on individually developing microcolonies (from two cells 395 µm distant). Bar, 1 mm.

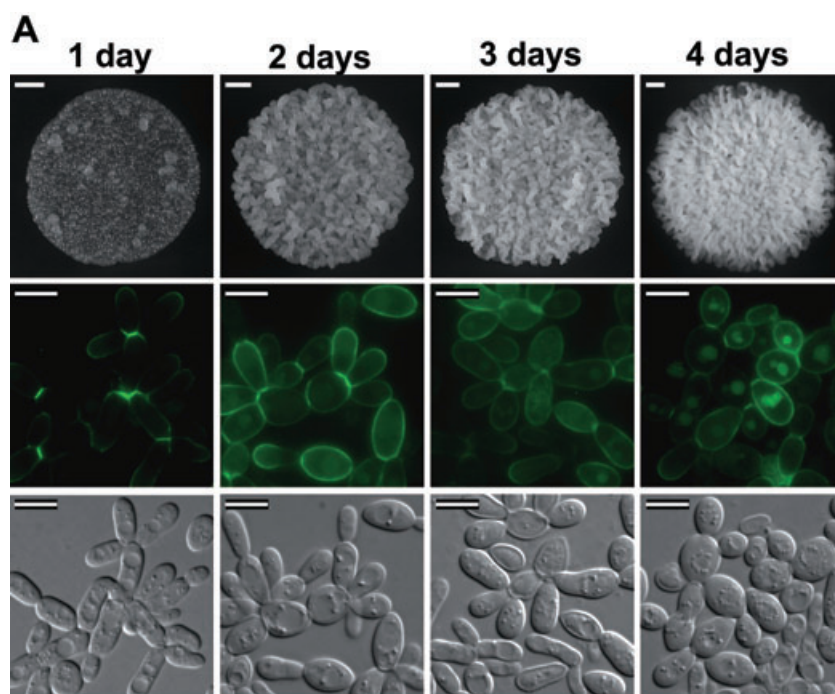
**C.** Examples of radial clusters from young  $\Sigma S^h$ -Flo11p-GFP microcolonies. Some Flo11p-GFP containing clusters of mostly oval cells (b) can be observed among majority of Flo11p-GFP non-producing clusters (a) already in 9-hour-old densely plated microcolonies. The number of clusters formed by elongated cells (c and d) increases from 24 to 48 h of microcolony development (C50-C500). White-black arrows mark centres of the two radial cell clusters (harvested from 48 h old microcolonies, C500), from which pseudohyphae started to expand (e). Cells visualized by Nomarski contrast and GFP-fluorescence of Flo11p-GFP are shown. Bar, 5 µm.

**D.** Radial clusters from 48 h old  $\Sigma S^h$ -flo11 microcolonies (C50-C500). Neither largely elongated cell clusters (see Cd for  $\Sigma S^h$ -Flo11p-GFP) nor pseudohyphae are present. Bar, 5 µm.

formation, some regularity was found. The solitary growing microcolony usually first developed a circular wrinkle on its periphery and sometimes one central wrinkle in parallel (Fig. 3B and Video S1). However, wrinkle development on microcolonies growing in a crowd was strictly dependent on microcolony distance. Those microcolonies grown from cells plated closer than 0.2 mm joined within the first 24 h and consequently behaved as one entity and developed common wrinkles at their periphery and central region (Fig. 3A and B; Video S1, green arrow). In contrast, those microcolonies arising from more distant cells, which join only several hours later, remained separated and each formed its own wrinkle

(Fig. 3B; Video S1, red arrow). Thus, the original dissemination of microcolony stirps was important for the resulting wrinkle development of neighbouring microcolonies: they either unified and developed further as one entity, or remained as autonomous microcolonies.

After aerial wrinkle formation, the subsequent development of the typical fluffy colony structure continued over several days. During this period, no newly formed wrinkles were observed at the colony periphery and the development proceeded inside the colony by increasing the size, waving, and sometimes by joining and splitting already formed wrinkles, which often did not have enough space to grow further horizontally (Video S1).

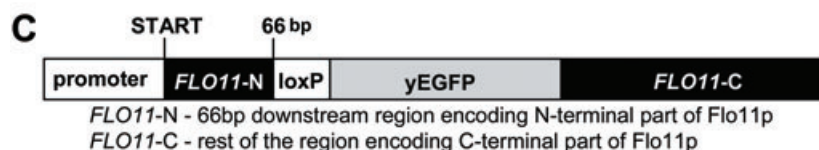
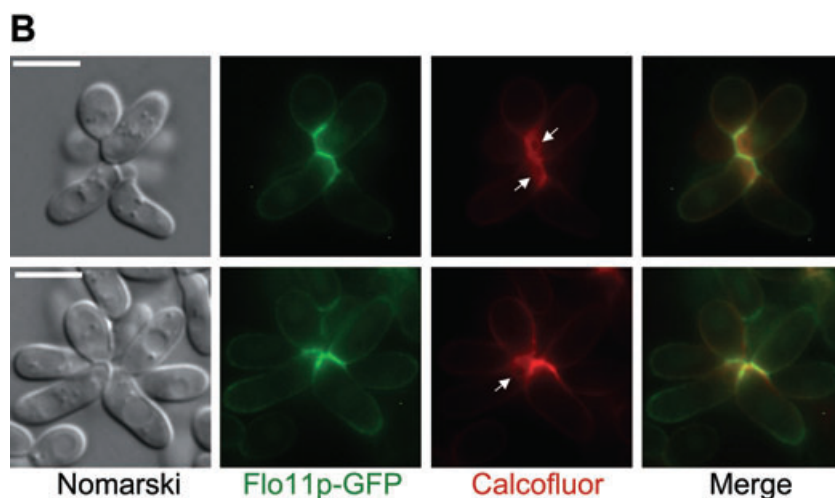


**Fig. 4.** Localization of Flo11p-GFP in cells of older  $\Sigma S^h$ -Flo11p-GFP colonies.

A. Changes in Flo11p-GFP localization during development of densely (C50000) plated microcolony population forming consequently giant colony. Initial Flo11p-GFP appearance at bud-neck regions and consequently at the tip of elongated cells correlates with the initiation of the formation of aerial structure (day 1); Flo11p-GFP localizes to the whole cell surface during the period of intensive formation of wrinkles (day 2); Flo11p-GFP level gradually decreases during days 3–4 and the GFP signal appears in the vacuoles (day 4). Colonies, bar, 1 mm; cells, bar, 5  $\mu$ m.

B. The 24-hour-old  $\Sigma S^h$ -Flo11p-GFP stained with Calcofluor white. Flo11p-GFP colocalizes with calcofluor to bud-necks of radial clusters, but it does not localize to scar-rings (white arrow). Green, GFP; red (false colour), Calcofluor white. Bar, 5  $\mu$ m.

C. Scheme of *FLO11* gene tagged with loxP-GFP module in the genome of  $\Sigma S^h$ -Flo11p-GFP strain.



*Flo11p* surface flocculin is not involved in the first dimorphic transition leading to oriented growth and initial area colonizing, but it is essential for second dimorphic transition and aerial structure formation

To be able to evaluate the possible role of Flo11p during the development of  $\Sigma S^h$  microcolonies, we constructed a  $\Sigma S^h$ -Flo11p-GFP strain containing the *FLO11* gene fused

with the GFP gene directly in the genome, i.e. under the control of its own promoter. In this construct, the GFP gene was introduced after the *FLO11* signal sequence to ensure that both the secretion sequence and C-terminus, important for GPI-anchor tagging, were preserved (Fig. 4C). In the resulting  $\Sigma S^h$ -Flo11p-GFP strain, the Flo11p-GFP protein properly localized to the cell surface and  $\Sigma S^h$ -Flo11p-GFP colony morphology and develop-



ment was identical to that of the  $\Sigma S^h$  colony (Fig. 4A). In parallel, we prepared the isogenic  $\Sigma S^h$ -*flo11* strain lacking a functional *FLO11* gene.

In young microcolonies, the first visible production of Flo11p-GFP was dependent on plating density. The initial Flo11p-GFP fluorescence was observed as early as 9 h after C50000 plating and as late as approximately 36 h when solitary microcolonies (C5) were plated. The first visible Flo11p-GFP fluorescence signal was never spread over the cell surface, but always specifically localized to the area of the bud neck of either rounded or elongated cells (Fig. 3C, b,c). Hence, strong Flo11p-GFP signal was visible at the joining site of the cell clusters within smooth microcolonies. Calcofluor white staining of scars of  $\Sigma S^h$ -Flo11p-GFP cells showed colocalization of GFP and Calcofluor in the joining sites of the clusters (Fig. 4B). Flo11p-GFP, however, never exhibited scar ring localization, which was often visible for the Calcofluor. This suggests that Flo11p localizes to the sites of the division, but it does not encircle emerging buds. As cells became more elongated, Flo11p-GFP started to appear at opposite site, i.e. at the cell tip (Fig. 3C, d). Approximately one day after the first visible Flo11p-GFP appearance, the second dimorphic transition to pseudohyphal growth and the aerial structure organization were initiated. In parallel, Flo11p-GFP signal at the tip intensifies and later becomes spread to the whole surface of elongated cells, in some cells still being the most intensive in the bud-neck regions (Fig. 3C, e; Fig. 4A, 2 and 3 days).

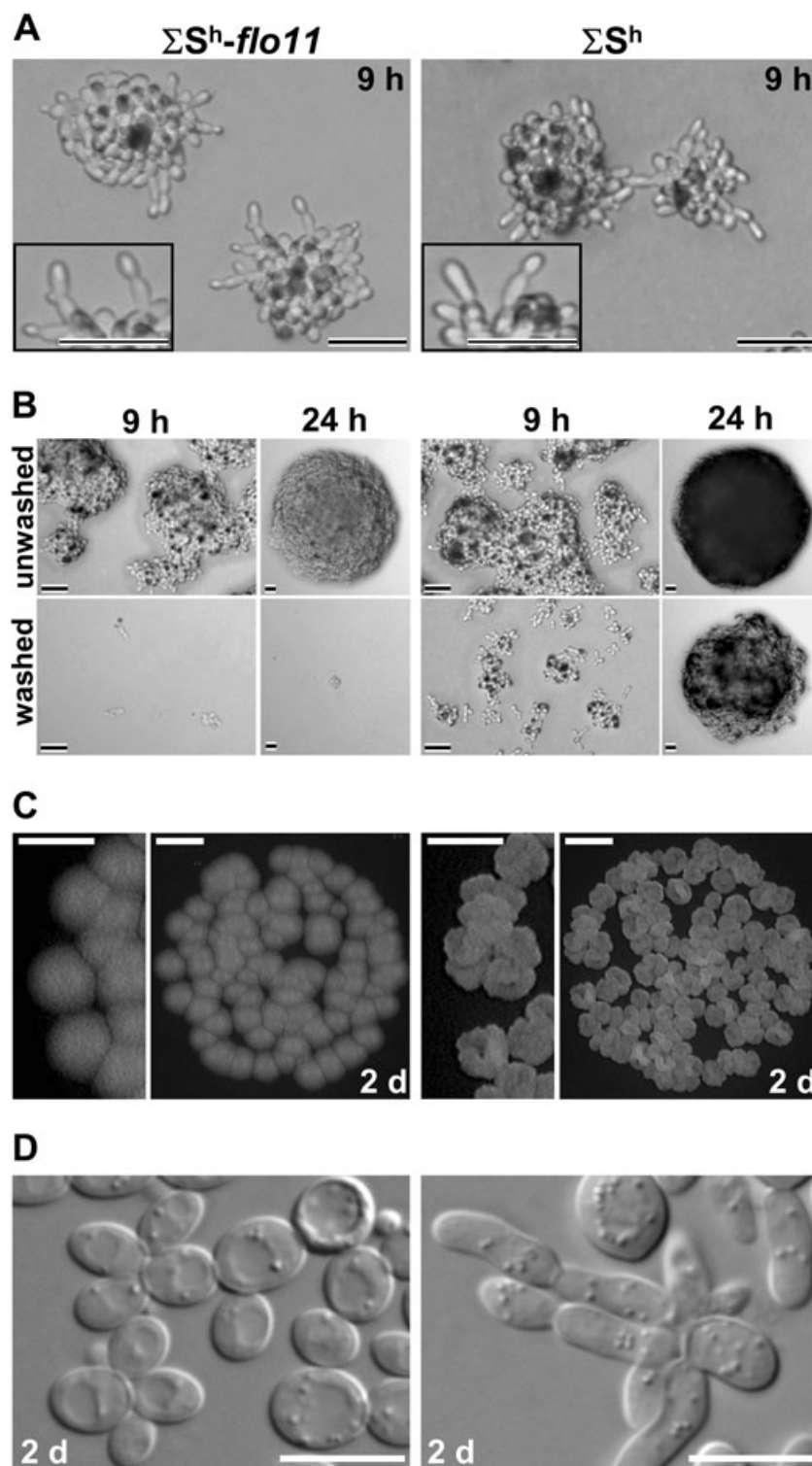
In colonies with fully developed wrinkles (e.g. 3–4 days old, C50000 plating), the cell surface Flo11p-GFP fluorescence became weaker and a relatively strong GFP signal appeared in the vacuoles (Fig. 4A), indicating that a fraction of the surface Flo11p-GFP was probably removed by endocytosis. As the colony population became more heterogeneous in this period, it also contained rounded cells with an intense Flo11p-GFP signal on their surface (Fig. 4A). In aged 8-day-old colonies, cells in central areas were mostly oval and rounded with weak surface-localized Flo11p-GFP and a vacuolar GFP signal, while cells forming colony margin still contained, besides a vacuolar, a strong GFP signal on their surface (data not shown).

Analysis of the development of young  $\Sigma S^h$ -*flo11* microcolonies revealed that both the initial dimorphic transition to unipolar budding and the oriented growth towards neighbouring colonies were not affected by the absence of Flo11p (Fig. 5A). However, the subsequent organization of the aerial structure was completely abolished and the  $\Sigma S^h$ -*flo11* strain developed only smooth colonies (Fig. 5C). Likewise parental strain microcolonies, young  $\Sigma S^h$ -*flo11* microcolonies were also composed of radial clusters of oval and short elongated cells (Fig. 3D), which, however, never reached the length of parental cells

having Flo11p-GFP localized at the tip (Fig. 3C, d). In addition,  $\Sigma S^h$ -*flo11* clusters were usually composed of fewer cells than those of the parental strain. The second dimorphic transition leading to pseudohyphae formation was completely abolished and older (2–3 days old)  $\Sigma S^h$ -*flo11* smooth colonies were thus formed mostly by oval cells (Fig. 5D). In addition, presence of Flo11p was essential for cell attachment to the agar (Fig. 5B). Some cells attached to the agar appeared even in 9-hour-old densely growing  $\Sigma S^h$  microcolonies, i.e. in colonies, which already contained some cells with Flo11p-GFP signal. The attachment intensified in  $\Sigma S^h$  smooth colonies just before the second transition and wrinkle formation. In contrast, almost no cells remained attached to the agar after washing of  $\Sigma S^h$ -*flo11* microcolonies (Fig. 5B). In this developmental stage, smooth  $\Sigma S^h$ -*flo11* microcolonies started to be more flat than those of the  $\Sigma S^h$  strain, showing that the three-dimensional organization of microcolonies was disrupted by the absence of Flo11p (Fig. 5B).

## Discussion

Our study revealed that territory colonizing and organization of *S. cerevisiae* population into structured colony are dependent on the two differently regulated events of dimorphic transition (Fig. 6). Early development of both the haploid  $\Sigma S^h$  and diploid  $\Sigma 1278^d$  significantly differs when an individual cell grows and divides in isolation, or if more cells are present in proximity. Solitary cell forms a smooth-edge microcolony, without any unipolarly budding filaments on its margin. In contrast, when more cells occurring in proximity form microcolonies, the cells of their margin quickly switch to unipolar budding and form elongated cells or pseudohyphae preferentially oriented mutually towards the neighbour. The rate and efficiency of this ploidy-independent dimorphic change and oriented growth is dependent on population density and it is very probably induced by cell–cell communication among the developing microcolonies. This early dimorphic transition to the unipolar oriented growth is entirely different from the transition of diploid  $\Sigma 1278$  cells to pseudohyphae in older colonies grown on SLAD agar (Gimeno *et al.*, 1992; Fig. 2B, 3-day-old colonies) as well as from high-cell-density-induced morphogenetic switch controlled by the aromatic alcohols phenylethanol and tryptophol (Chen and Fink, 2006). Both these previously described events occur under conditions of nitrogen starvation. In contrast, cell unipolar growth out of the colonies can be induced by volatile ammonia as well as by other volatile amines. It can be potentiated by increased ammonium concentration in the medium and less efficiently also by increase in the medium pH. These findings, together with the detection of ammonia produced shortly after giant colony



**Fig. 5.** Absence of Flo11p affects distinct phases of colony development in different ways.

A.  $\Sigma S^h$ -flo11 (left) undergoes early dimorphic transition and exhibits oriented unipolar growth like the parental  $\Sigma S^h$  (right).

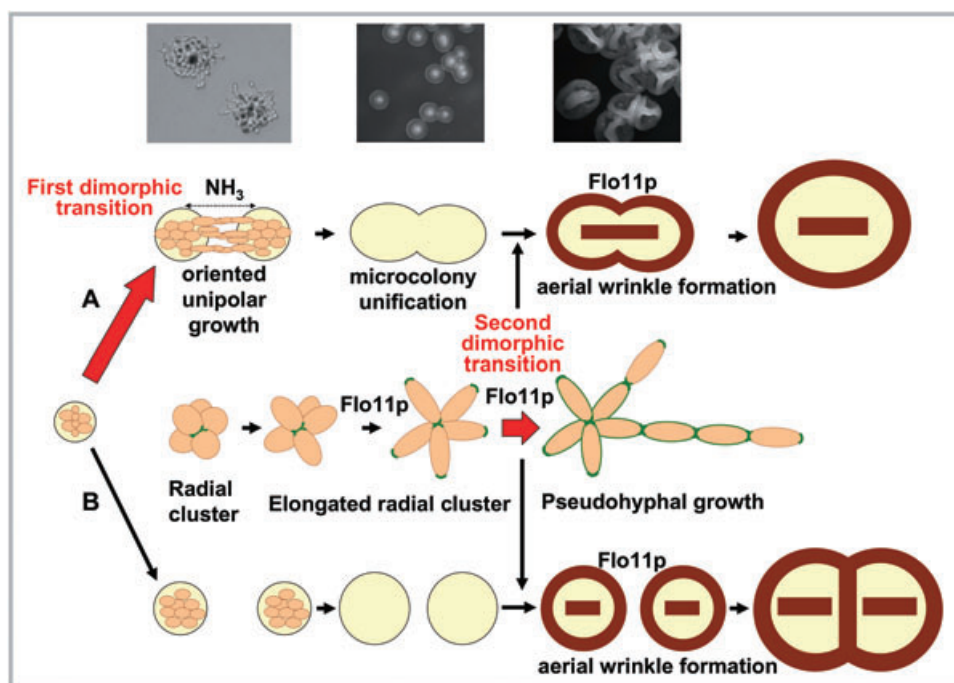
B.  $\Sigma S^h$ -flo11 microcolonies are more flat than  $\Sigma S^h$  microcolonies. Their cells lack the ability to adhere the agar (washed). Left, densely (C50000) plated 9-hour-old microcolonies; right, solitary (C50) plated 24-hour-old microcolonies.

C.  $\Sigma S^h$ -flo11 microcolonies (left) are defective in the formation of aerial structure as compared with  $\Sigma S^h$  microcolonies (right).

D. The cells of  $\Sigma S^h$ -flo11 microcolonies (left) are more rounded than cells of  $\Sigma S^h$  microcolonies (right). Black-white bar, 20  $\mu$ m; white bar (cells), 5  $\mu$ m; white bar (colonies), 1 mm; d, day.

inoculation (Palkova *et al.*, 1997) and observation that ammonia induces formation of cell-chains in liquid GM, strongly support the hypothesis that volatile ammonia itself could function as the signalling molecule, which induces oriented unipolar growth in young microcolonies

(Fig. 6). The finding that other volatile amines can substitute ammonia function suggests that mechanism of its action could be connected with pH changes of internal cellular compartments (e.g. vacuoles) similarly as it was proposed for *D. discoideum* (Gross *et al.*, 1983).



**Fig. 6.** The scheme of regulation and roles of the two distinct dimorphic transitions during *S. cerevisiae* territory colonizing and population development. Development of either colonies growing in tight proximity (A) or colonies, which are more distant (B). Important role of ammonia in the transition to unipolar budding and oriented growth (first dimorphic transition) as well as essential role of Flo11p in cell elongation and formation of aerial structure (second dimorphic transition) are depicted. The development of radial clusters within whole microcolonies in both (A) and (B) is indicated in central part of the scheme. Red arrows indicate two distinct dimorphic transitions. Brown lines/contours indicate position of wrinkles.

In contrast to the natural situation where ammonia is produced by sparse microcolonies, treatment with a high-dose uniform artificial ammonia cloud or excess of ammonium in the medium leads to the non-oriented formation of unipolarly budding cells from the colony in all directions, similarly to the behaviour under conditions of high density plating. Thus, one can hypothesize that the small amount of ammonia produced by neighbouring colonies forms a gradient, which is mutually sensed by microcolonies and induces the oriented unipolar growth of their cells. In an excess of the signalling molecule, the gradient is destroyed and cells grow unipolarly in all directions from the colony. This is supported by finding that asymmetric pulse of ammonia or other volatile amine applied on sparsely plated microcolonies leads to asymmetrically localized unipolarly budding cells on the colony side oriented towards the ammonia source (Fig. 1B and Fig. S3). Similar yeast behaviour has been described during the mating of haploid cells of opposite mating type. Also there, the proper concentration of the pheromone arriving at cells in the form of an oriented gradient is required for proper shmoo orientation and highly efficient mating (Jackson and Hartwell, 1990). Characteristics of the ammonia-induced dimorphic transition of cells plated at high density resemble those of the quorum-sensing

phenomenon, where autoregulatory molecules released in a cell density-dependent fashion cause a coordination of whole community behaviour (Bassler, 2002). Nevertheless, as current techniques do not enable us to directly monitor the gaseous ammonia gradient produced by individual microcolonies, definitive proof of its effect in a natural environment remains to be found.

The above data imply an intriguing question, why small microcolonies growing in relative proximity have evolved the system (Fig. 6), which allows them not only to find their surrounding neighbours, but also to grow towards them and not onto a free, nutrient-rich space. In contrast to the previously described behaviour of much older colonies, in which the initiation of ammonia production by nutrient shortage leads to colony growth towards areas of less nutrient competition (Palkova *et al.*, 1997), these small young microcolonies are still growing in nutrient excess. Thus, it seems that in this early developmental stage neighbouring dividing yeast cells and small microcolonies prefer to unify to form a more numerous community, which consequently develops and behaves synchronously. This strategy could be advantageous for at least two reasons. First, under natural conditions, more cells should have more chance to survive than fewer cells. This can be advantageous for yeast colonizing the host

organism or forming a biofilm, where quick occupation of a territory by numerous cooperating cells brings better protection against host immune system and/or allows quick formation of extracellular matrix protective layer. Second, unification into one structure prevents the possible subsequent competition for space and nutrients since after the unification, the cells of original microcolonies develop regularly within one multicellular community. This can be supported by observation that the unification of small adjacent microcolonies can occur only before the first wrinkles start to form on their surface. Then the unification is confirmed by the formation of one common wrinkle surrounding the unified microcolonies, while non-unified microcolonies each form their own wrinkle (Fig. 3, Video S1). In contrast to unified microcolonies, clear space competition is visible among wrinkle-separated colonies (Video S1) over the next few days. From this point of view, oriented growth of non-motile yeast cells can, to some extent, substitute the aggregation capabilities of motile bacteria (or other microorganisms), important for various forms of social microbial behaviour (Shimkets, 1990).

Early dimorphic transition and oriented growth occur predominantly at margin regions of adjacent microcolonies independently of Flo11p flocculin. On the contrary, Flo11p is required for the second dimorphic transition, which occurs throughout the whole microcolonies and leads to the formation of aerial structure (Fig. 6). This is documented by finding that  $\Sigma S^h$ -*flo11* cells fail to form pseudohyphal cells arising from the radial clusters and they do not create aerial structure, although their young microcolonies are able to switch from axial to unipolar budding and to perform oriented growth. Aged  $\Sigma S^h$ -*flo11* smooth colonies are composed of mostly rounded cells. Hence, Flo11p is apparently indispensable for both elongation of cells in the clusters and consequent dimorphic transition to pseudohyphal growth of cells forming wrinkles. It also participates in (but it is not essential for) cell–cell adhesion within the radial cluster ( $\Sigma S^h$ -*flo11* clusters usually contain fewer cells than  $\Sigma S^h$  clusters). Polarized localization of GFP-tagged Flo11p to the bud neck of axially and unipolarly budding cells and its later appearance also at the tip of elongated cells resembles localization of various proteins involved in establishment of yeast cell polarity (Madden and Snyder, 1998; Cullen and Sprague, 2002) and suggests a similar role of Flo11p. Later, during formation of wrinkles, i.e. during the process which is strictly dependent on Flo11p presence, the amount of Flo11p-GFP increases and it spreads to the whole cell surface. Interestingly, in already developed wrinkles, asymmetric Flo11p localization at the bud-neck and at the tip is still visible in some elongated cells, while more rounded cells have Flo11p spread over the whole surface. These data suggest that Flo11p may be directly

involved in the process of initiation of aerial structure formation and regulation of cell-oriented growth from the radial clusters and arrangement of cells within the three-dimensional colony structure. At later phases Flo11p may be also involved in the attachment and interconnection of elongated and rounded cells within the wrinkles. This is supported by observation that Flo11p is indispensable for attachment of massive number of cells to the surfaces (Fig. 5B) as also described previously (Reynolds and Fink, 2001).

Our discovery of nutrient- and Flo11p-independent dimorphic transition induced in conditions of high nitrogen independently on carbon source indicates as yet unknown possibilities of *S. cerevisiae* behaviour under natural conditions. Dimorphic transition of *S. cerevisiae* cells was until now doubted for nitrogen- and glucose-rich serum (Crispens, 1975) or even ruled out for older yeast populations grown on nitrogen-rich agar plates (Gimeno *et al.*, 1992). The finding of ammonia as inducing agent implies that increase in pH shifting ammonium/ammonia ratio in favour of ammonia (Palkova and Vachova, 2003) can potentiate dimorphic transition, and thus could help yeast to colonize particular niche. Ammonia (or possibly some volatile amines) can even function as an attractant inducing oriented yeast growth towards the ammonia producer, e.g. either wounded fruit or particular tissue of a host organism. Fruits can release  $NH_3$  by the action of phenylalanine-ammonia lyase, which is activated by a wound (Kato *et al.*, 2000) or during ripening (Gatto *et al.*, 2008). In mammals, brain is the organ where ammonia/ammonium metabolism plays important role and, interestingly, it is the organ in which *S. cerevisiae* survive the best at least in CD-1 mice (McCusker, 2006).

## Experimental procedures

### Strains

The *S. cerevisiae* diploid strain  $\Sigma 1278^d$  (a/ $\alpha$ ) was obtained from H. Sychrová (AS CR, Prague, Czech Republic); its haploid derivative  $\Sigma S^h$  (a) was obtained by sporulation (Vopálenská *et al.*, 2005).  $\Sigma S^h$ -*flo11* (a, *flo11::kan*) and  $\Sigma S^h$ -Flo11p-GFP (a, *FLO11*-GFP) strains were prepared in this study.

### Media and cultivation

Yeast liquid cultures were grown in YPD (1% yeast extract, 1% pepton, 2% glucose), GM (1% yeast extract, 3% glycerol), YPGal (1% yeast extract, 1% pepton, 2% galactose) and liquid SLAD (Gimeno *et al.*, 1992). For liquid culture experiments, the exponential cells grown in YPD medium were diluted to an  $A_{600}$  of 0.01 into GM or liquid SLAD medium with supplements and adjustments described below. Colonies were grown on GMA (GM with 2% agar), on GMA-BKP (GMA supplemented with the pH indicator bromocresol purple (BKP) to a final concentration of 0.01%; pH 5.2) or on SLAD



agar (Gimeno *et al.*, 1992) at 28°C. When required, the media were supplemented with either 200 µg ml<sup>-1</sup> Geneticin (GMA-G418) (Sigma-Aldrich) or 10 µg ml<sup>-1</sup> Phleomycin (GMA-Phleo) (InvivoGen), or the following adjustments were made: (i) lowering the glycerol concentration in GMA-BKP to 0.5%; (ii) supplementation of GM and GMA-BKP with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to final concentrations of 50 and 75 mM respectively; (iii) supplementation of GM with 7.6, 50 and 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and modifying the pH to 7.3 with 1 M NaOH; (iv) modifying the initial GMA-BKP pH to 5.5 or 6.5 with 1 M NaOH; and (v) liquid SLAD and SLAD agar supplementation with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to final concentrations of 7.6, 37.9 or 75.7 mM. BKP changes colour from yellow (pH ≤ 5.2) through violet (pH 6.5) to purple (pH ≥ 6.8).

#### Determination of cell budding pattern

The budding pattern of the cells from liquid medium or in colonies was ascertained by evaluating the cell arrangement in cell clusters. When required, the budding pattern was confirmed by staining the bud scars with 0.2 µM Calcofluor white (Vopalenska *et al.*, 2005). The proportion of unipolarly budding cells and pseudohyphal cells on the periphery of young microcolonies was followed *in situ*. The presence of these cells in wrinkles or inside the microcolonies was determined by evaluating cells harvested from microcolonies.

#### Exposure of cells to ammonia or amine vapour

Ammonia was generated in a small vessel containing 1 M NH<sub>4</sub>Cl in 1 M NaOH (Palkova *et al.*, 1997). 1 M methylamine or 1 M propylamine was prepared from 12 M stock solutions (Sigma) diluted in H<sub>2</sub>O in the vessel. The vessels were placed near the agar as indicated in the scheme in Fig. 1B for 15 min, 1 h after plating the cells on GMA.

#### Construction of $\Sigma S^h$ -Flo11p-GFP strain

The LoxP-GFP module was inserted behind the 66th bp downstream of the *FLO11* coding region (Fig. 4C) using internal tagging as described (Gauss *et al.*, 2005). The loxP-kanMX6-GFP transformation module was amplified by PCR from plasmid pOM40 (containing the kanMX6 marker and GFP tag) using PPP Master Mix (TopBio) and the primers MA1 (gcttatttggtccttcgctctatttaactcggtttgggttttgcaggtcgac aacccttaatt) and MA2 (acagctagttccttcgagatcctcttgaacta gtgcagttggcgccgcgcagtaggcact). Transformants were selected on GMA-G418. The kanMX6 marker was removed by transforming the cells with plasmid pSH65 (containing Cre-Recombinase and the ble<sup>r</sup> marker gene) as described (Guedener *et al.*, 2002). Positive transformants were selected on GMA-Phleo plates. Cre expression was induced by shifting the cells grown overnight in YPD to YPGal (both media supplemented with 10 µg ml<sup>-1</sup> Phleomycin) for 2 h. Approximately 200 cells were then plated on GMA and cells, which lost kanMX6 were detected by replica plating onto GMA-G418. Selected clones were examined under the fluorescence microscope and the integration of the loxP-GFP module was verified by colony PCR (Gauss *et al.*, 2005).

#### Deletion of *FLO11* gene

Deletion of the *FLO11* gene was performed using a disruption cassette, as described (Guedener *et al.*, 2002). The cassette was amplified by PCR with primers DEL1 (ttaaaatatacttt ttaggcctcaaaaatccatatacgacactcagctgaagcttcgtacgc) and DEL2 (atgaaaacatcgtaataagaacgaacatgttggaattgtatcagca taggcactagtggga) homologous to the flanking regions of *FLO11* ORF and complementary to plasmid pUG6 (containing kanMX6 marker gene) or plasmid pUG66 (containing ble<sup>r</sup> marker gene). The cassette was transformed into yeast cells and positive transformants were selected on GMA-G418 or GMA-Phleo plates. Selected clones were then examined by colony PCR for the presence of the kanMX6 or ble<sup>r</sup> marker integrated instead of the *FLO11* gene.

#### Yeast transformation

$\Sigma S^h$  cells were transformed as described (Gietz and Woods, 2002). Before plating on selection medium (GMA-G418 or GMA-Phleo), cells were incubated for 3 h in YPD at 28°C with shaking. Plates were incubated at 28°C for 4 days.

#### Photography of colonies and cells

Larger colonies were photographed with illuminating light from above. A HITACHI HV-C20 colour camera with Cosmocar or Navitar objectives was used, along with a Fiber-Lite PL-800 and Kaiser Prolite illumination system and NIS-Elements AR 2.30 software (Laboratory Imaging). The time-laps experiments documenting colony development (for video acquiring) were performed using camera Nikon DS-5M with objective Navitar 12× Zoom 12:1 with led diode illumination, operated by time-lapse image recording NIS-elements system (Laboratory Imaging). The cells and young microcolonies were photographed with a high performance CCD camera (Cohu) and microscope (Leica DMR) with a 10×, 20× or 40× objective. Cells with Flo11p-GFP were evaluated under an HCX PL fluotar 100×/1.3 oil objective with a GFP filter, when stained with Calcofluor white with a UV filter (excitation 340–380 nm) and under Nomarski contrast with Leica DMR.

#### Acknowledgements

We thank D. Maišaidrová for excellent technical assistance. This study was supported by grants from the Grant Agency of Academy of Sciences IAA500200506, Grant Agency of the Czech Republic 204/08/0718 and from the Ministry of Education (LC06063 and LC531, Research Concepts MSM0021620858 and AV0Z50200510) and by the Howard Hughes Medical Institute International Research Award (#55005623 to Z.P.).

#### References

- Alem, M.A., Oteef, M.D., Flowers, T.H., and Douglas, L.J. (2006) Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell* **5**: 1770–1779.

- Bassler, B.L. (2002) Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* **109**: 421–424.
- Chen, H., and Fink, G.R. (2006) Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev* **20**: 1150–1161.
- Crispens, C.G. (1975) Section IV: Blood. In *Handbook of the Laboratory Mouse*. Springfield, IL, USA: Charles C. Thomas Pub. Ltd., pp. 93–123.
- Cullen, P.J., and Sprague, G.F. Jr (2002) The roles of bud-site-selection proteins during haploid invasive growth in yeast. *Mol Biol Cell* **13**: 2990–3004.
- Davies, L., Satre, M., Martin, J.B., and Gross, J.D. (1993) The target of ammonia action in dictyostelium. *Cell* **75**: 321–327.
- Douglas, L.J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* **11**: 30–36.
- Dranginis, A.M., Rauceo, J.M., Coronado, J.E., and Lipke, P.N. (2007) A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 282–294.
- Gancedo, J.M. (2001) Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 107–123.
- Gatto, P., Vrhovsek, U., Muth, J., Segala, C., Romualdi, C., Fontana, P., et al. (2008) Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *J Agric Food Chem* **56**: 11773–11785.
- Gauss, R., Trautwein, M., Sommer, T., and Spang, A. (2005) New modules for the repeated internal and N-terminal epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **22**: 1–12.
- Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**: 87–96.
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* lead to filamentous growth – Regulation by starvation and Ras. *Cell* **68**: 1077–1090.
- Gross, J.D., Bradbury, J., Kay, R.R., and Peacey, M.J. (1983) Intracellular pH and the control of cell differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **303**: 244–245.
- Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G.J., Voss, D., and Hegemann, J.H. (2002) A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **30**: e23.
- Jackson, C.L., and Hartwell, L.H. (1990) Courtship in *S. cerevisiae*: both cell types choose mating partners by responding to the strongest pheromone signal. *Cell* **63**: 1039–1051.
- Juhas, M., Eberl, L., and Tummeler, B. (2005) Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* **7**: 459–471.
- Kato, M., Hayakawa, Y., Hyodo, H., Ikoma, Y., and Yano, M. (2000) Wound-induced ethylene synthesis and expression and formation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase, ACC oxidase, phenylalanine ammonia-lyase, and peroxidase in wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Plant Cell Physiol* **41**: 440–447.
- Keller, L., and Surette, M.G. (2006) Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* **4**: 249–258.
- Kruppa, M. (2009) Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses* **52**: 1–10.
- Liu, H., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1996) *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. *Genetics* **144**: 967–978.
- Lo, W.S., and Dranginis, A.M. (1998) The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9**: 161–171.
- McCusker (2006) *Saccharomyces cerevisiae*: an emerging and model pathogenic fungus. In *Molecular Principles of Fungal Pathogenesis*. Heitman, J., Filler, S.G., Edwards, J.E., Mitchell, A.P. (eds). Washington, DC, USA: ASM Press, pp. 245–259.
- Madden, K., and Snyder, M. (1998) Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu Rev Microbiol* **52**: 687–744.
- Nickerson, K.W., Atkin, A.L., and Hornby, J.M. (2006) Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3805–3813.
- Palkova, Z., and Vachova, L. (2003) Ammonia signalling in yeast colony formation. *Int Rev Cytol* **225**: 229–272.
- Palkova, Z., and Vachova, L. (2006) Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 806–824.
- Palkova, Z., Janderova, B., Gabriel, J., Zikanova, B., Pospisek, M., and Forstova, J. (1997) Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* **390**: 532–536.
- Palkova, Z., Devaux, F., Ricicova, M., Minarikova, L., Le Crom, S., and Jacq, C. (2002) Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol Biol Cell* **13**: 3901–3914.
- Radford, D.R., Challacombe, S.J., and Walter, J.D. (1994) A scanning electron-microscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of *Candida albicans*. *J Med Microbiol* **40**: 416–423.
- Reynolds, T.B., and Fink, G.R. (2001) Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291**: 878–881.
- Roberts, R.L., and Fink, G.R. (1994) Elements of a single map kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate 2 developmental programs in the same cell-type – mating and invasive growth. *Genes Dev* **8**: 2974–2985.
- Shimkets, L.J. (1990) Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev* **54**: 473–501.
- Sudbery, P., Gow, N., and Berman, J. (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12**: 317–324.
- Vachova, L., Kucerovala, H., Devaux, F., Ulehlova, M., and Palkova, Z. (2009) Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environ Microbiol* **11**: 494–504.
- Vopalenska, I., Hulkova, M., Janderova, B., and Palkova, Z. (2005) The morphology of *Saccharomyces cerevisiae* colonies is affected by cell adhesion and the budding pattern. *Res Microbiol* **156**: 921–931.

## Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Fig. S1.** Density of plating influences polarity of cell growth and microcolony development.

**Fig. S2.** Effect of ammonia on morphology of  $\Sigma S^h$  cells growing in liquid GM medium.

**Fig. S3.** Effect of ammonia and other amines on development of young solitary microcolonies.

**Fig. S4.** Effect of ammonia, ammonium and pH on development of young solitary microcolonies.

**Fig. S5.** Impact of ammonium sulfate concentration on morphology of cells growing in liquid or on solid SLAD.

**Video S1.** Development of  $\Sigma S^h$  microcolonies.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.



# New biosensor for detection of copper ions in water based on immobilized genetically modified yeast cells

Irena Vopálenská<sup>a</sup>, Libuše Váchová<sup>b,\*</sup>, Zdena Palková<sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Microbiology of the ASCR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 10 April 2015

Accepted 5 May 2015

Available online 6 May 2015

### Keywords:

Yeast biosensor

Copper ion detection

Purine synthesis pathway

Alginate beads

Contaminated water

## ABSTRACT

Contamination of water by heavy metals represents a potential risk for both aquatic and terrestrial organisms, including humans. Heavy metals in water resources can come from various industrial activities, and drinking water can be ex-post contaminated by heavy metals such as  $\text{Cu}^{2+}$  from house fittings (e.g., water reservoirs) and pipes. Here, we present a new copper biosensor capable of detecting copper ions at concentrations of 1–100  $\mu\text{M}$ . This biosensor is based on cells of a specifically modified *Saccharomyces cerevisiae* strain immobilized in alginate beads. Depending on the concentration of copper, the biosensor beads change color from white, when copper is present in concentrations below the detection limit, to pink or red based on the increase in copper concentration. The biosensor was successfully tested in the determination of copper concentrations in real samples of water contaminated with copper ions. In contrast to analytical methods or other biosensors based on fluorescent proteins, the newly designed biosensor does not require specific equipment and allows the quick detection of copper in many parallel samples.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Due to both natural sources and certain industrial enterprises, the environment, including water resources, becomes contaminated by various pollutants including heavy metals. Such contamination poses serious problems for terrestrial and aquatic organisms and to human health. The heavy metals accumulated in the environment usually cannot be degraded naturally. Considerable amounts of heavy metals also penetrate the surface water system and accumulate in sediments. Among the heavy metals, copper is both an essential nutrient, as a constituent of some enzymes, and a drinking-water contaminant. The value recommended by the World Health Organization (WHO) guidelines is 2 mg of  $\text{Cu}^{2+}$  per liter of water. This is based on the presumption that adults consume 2 or 3 l of water per day and ingest additional copper from food. Copper consumption should not exceed an upper limit of 10 mg per day. However, copper concentrations in drinking water can range from  $\leq 0.005$  to  $> 30$  mg/L, primarily as a result of the interior corrosion of copper plumbing (WHO, 2008).

Heavy metals can be detected using many analytical methods such as atomic absorption spectrometry (AAS), inductively

coupled plasma optical emission spectrometry (ICP/OES) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP/MS) (WHO, 2008), which are costly and time-consuming and require expensive specialized equipment and highly qualified staff. The limits of copper detection are 0.02  $\mu\text{g/L}$  by ICP/MS (Zhu et al., 2009), 0.3  $\mu\text{g/L}$  by ICP/OES (WHO, 2008) and 0.5  $\mu\text{g/L}$  by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) (Pourreza and Hoveizavi, 2005). These methods can reliably determine the total concentration of ions of heavy metals, including their insoluble forms, but they do not provide any information about the bioavailable concentrations of these metals, which is the amount that could be dangerous for living organisms. One way to address this problem is to use biosensors.

A biosensor is an analytical device that combines a biological component with a physicochemical detector, and it can be used for a detection of a specific analyte (Su et al., 2011). For example, one biosensor group is based on the ability of protein or DNA to bind heavy metals. In proteins, the binding of heavy metals predominantly to Cys residues can cause inhibition or activation of protein/enzyme activity.

Several important biosensors are based on intact cells (e.g., Belkin, 2003). Some of these biosensors can use the same enzymatic reactions as those based on isolated enzymes, but they are cheaper and can provide data on the bioavailability of pollutants and/or their effects on living systems. Intact cells provide ideal conditions for enzyme function. Cell-based biosensors include

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [vachova@biomed.cas.cz](mailto:vachova@biomed.cas.cz) (L. Váchová), [zdenap@natur.cuni.cz](mailto:zdenap@natur.cuni.cz) (Z. Palková).



either unmodified or genetically modified microorganisms, along with detection based on either the measurement of changes in the intensity of bioluminescence or fluorescence or the measurement of electrical parameters.

Biosensors using unmodified microorganisms are often based on the inhibitory effect of heavy metals on microbial cells. Thus, the decrease in luminescence intensity of *Photobacterium phosphoreum* was used to detect chromium reaching  $I_{50}$  at 0.85 mM  $\text{Cr}^{6+}$  (Lee et al., 1992). A conductometric biosensor detects the decrease in alkaline phosphatase activity of immobilized blue algae *Arthrospira platensis* caused by the presence of heavy metals (Tekaya et al., 2013). The  $I_{50}$  values were  $10^{-19}$  M for cadmium and  $10^{-17}$  M for mercury. In addition, lyophilized biomass of yeast *Rhodotorula mucilaginosa* (Yuce et al., 2010) or dead biomass of algae *Tetraselmis chuii* (Alpat et al., 2007) have been used to construct a voltammetric biosensor used to detect  $\text{Cu}^{2+}$ . These biosensors were based on the ability of the biomass to adsorb heavy metals from aqueous solutions, and it reached detection limits of  $10^{-7}$ – $10^{-5}$  M and  $4.6 \times 10^{-10}$  M, respectively.

Biosensors that use genetically modified microorganisms are usually based on the production of specific reporter protein (s) controlled by a promoter induced by heavy metal(s). The genetically modified bacillus *Alcaligenes eutrophus* increases its bioluminescence based on the heavy metal concentration. That detection is based on the reporter operon *luxCDABE* from *Vibrio fischeri* in combination with bacterial  $\sigma$ -54 promoter regions that are inducible by heavy metals. Thus, in combination with the *chrA* promoter, *A. eutrophus* predominantly detects chromium  $\text{Cr}^{6+}$  ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ); the presence of the *copSRA* promoter region, the *mer* regulatory region (*merR* and *mer* promoter) or the *pbrR* promoter enable the detection of copper, mercury or lead ions, respectively, with detection limits of 1.0  $\mu\text{M}$  for  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cr}^{6+}$  and 0.5  $\mu\text{M}$  for  $\text{Pb}^{2+}$ , respectively (Corbisier et al., 1999). A similar biosensor but combined with optical fibers was used later to detect copper ions (Leth et al., 2002). Copper ions can also be detected by biosensors using recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae*. This copper sensing is based on the presence of a plasmid containing the *lacZ* gene (from *Escherichia coli*) or a GFP gene controlled by the *CUP1* promoter, which is inducible by copper ions. The *CUP1* promoter is inducible specifically by  $\text{Cu}^{2+}$  or by silver ions (Dameron et al., 1991; Shetty et al., 2004). In the *lacZ*-based sensor, the enzyme  $\beta$ -galactosidase (encoded by the *lacZ* gene) was produced only in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  and enabled the yeast to utilize lactose. This sensor detected  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations of 0.5–2 mM  $\text{CuSO}_4$  (Lehmann et al., 2000). In the GFP-based biosensor, the production of GFP protein in a  $\text{Cu}^{2+}$ -dependent manner can be detected by monitoring the GFP fluorescence (Shetty et al., 2004). This system can detect  $\text{Cu}^{2+}$  with a lower limit of 0.5  $\mu\text{M}$ .

Most of the biosensors described above require specific devices for the detection of a pollutant. Here, we present a newly designed biosensor for detecting  $\text{Cu}^{2+}$  concentration visually by the evaluation of the red coloring of immobilized yeast *S. cerevisiae*; the evaluation of this sensor requires a comparison of the unknown sample (liquid or solid) with a parallel sample containing a known  $\text{Cu}^{2+}$  concentration. The biosensor uses a *S. cerevisiae* strain with the *ADE2* gene deleted from the genome and with the natural promoter regulating the expression of the *ADE5,7* gene replaced with the *CUP1* promoter (submitted Czech patent, Vopalenska et al., 2014). The resulting strain produces red pigment only in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  and in a quantity proportional to the copper concentration when in the range of 1–100  $\mu\text{M}$ . The intensity of the red coloring and therefore of the  $\text{Cu}^{2+}$  detection are optimal when the strain is immobilized.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains and media

Strain BY4742 (*MAT $\alpha$* ; *his3 $\Delta$ 1*; *leu2 $\Delta$ 0*; *lys2 $\Delta$ 0*; *ura3 $\Delta$ 0*) was obtained from the EUROSCARF collection. Strains BY-*ade2* (*MAT $\alpha$* ; *ade2 $\Delta$* ) and BY-*ade2*-P<sub>CUP</sub>-*ADE5,7* (*MAT $\alpha$* ; *ade2 $\Delta$* ; *Pcup1*-*ADE5,7*) were prepared in this study. The BY-*ade2* knockout strain was constructed using the kanMX replacement cassette amplified from plasmid pUG6 (obtained from the EUROSCARF collection) by PCR (see Table S1 for the primers). The BY-*ade2*-P<sub>CUP</sub>-*ADE5,7* strain was derived from BY-*ade2* using the *natNT2*-P<sub>CUP1</sub> cassette amplified from the plasmid pYM-N2 (EUROSCARF) (Table S1). The transformation was performed as described previously (Gietz and Woods, 2002).

Yeast cells were cultivated in liquid complete YPD (0.5% yeast extract, 1% peptone, 2% glucose), liquid YPAD (YPD, 40 mg/L adenine sulfate) or using agar media YPDA (YPD, 2% agar) and YPADA (YPAD, 2% agar). For selection of transformants, the media were supplemented with geneticin (400 mg/L) or nourseothricin (100 mg/L).

Red coloring of the BY-*ade2* and BY-*ade2*-P<sub>CUP</sub>-*ADE5,7* strains was monitored in minimal SD medium (0.19% yeast nitrogen base without amino acids and without copper, 0.5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2% glucose) with concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  (ranging from 0 to 100  $\mu\text{M}$ ) with shaking. Amino acids supplementing strain auxotrophies were added at concentrations of 50 mg/L (L-histidine, L-leucine, L-lysine), 30 mg/L (uracil) and 4 mg/L (adenine sulfate).

Red coloring of immobilized BY-*ade2*-P<sub>CUP</sub>-*ADE5,7* cells was monitored in SD medium with amino acid and uracil supplements and without adenine sulfate.  $\text{Cu}^{2+}$  was added in various concentrations (0–100  $\mu\text{M}$ ).

### 2.2. Preparation of alginate beads with immobilized yeast cells

Yeast cells were cultivated for 6 days in YPAD with shaking at 28 °C to reach the stationary phase. Then, 0.2 mL of the culture was mixed with 5 mL of 3% sodium alginate in distilled water (final cell concentration from 4 to  $8 \times 10^6$ /mL). Alginate beads with yeast cells were prepared by dropping the yeast cell-sodium alginate suspension into 5%  $\text{CaCl}_2$  and incubating for 30 min at 4 °C. Yeast cells within the beads were propagated by cultivation in YPAD at 28 °C with shaking for 36 h and then stored in distilled water at 4 °C.

### 2.3. Visual documentation of the red coloring

Red coloring of the cell suspensions in liquid media was documented by photographing 10 mL cultures in Petri dishes or beakers in transmitted light. Alginate beads with immobilized yeast cells were placed on microscope slides, and images were captured in transmitted light. Image capture used a ProgRes<sup>®</sup> CT3 CMOS camera with a Cosmimar TV zoom objective, the Kaiser illumination and NIS Elements software (Laboratory Imaging).

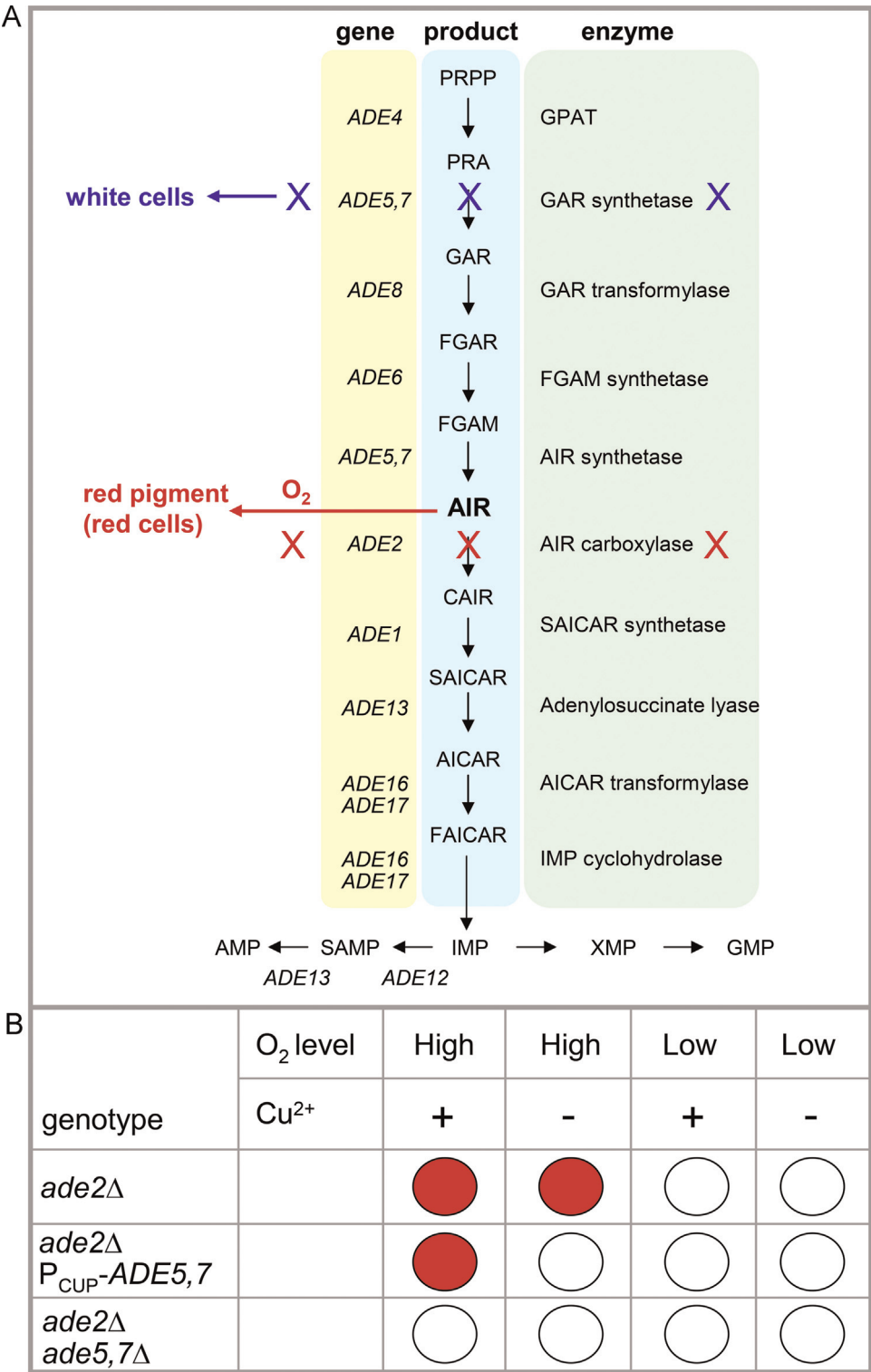
### 2.4. Incubation of copper pipes

Individual pieces of new plumbing copper pipe fittings (T Cu 5130, 22 × 22 × 22 mm), were immersed into 90 mL of different buffers or to distilled water. After 13 h of the incubation, the buffers/water were used for detection of  $\text{Cu}^{2+}$  concentration.

2.5. Quantification of the data

For quantification of copper concentrations, the pictures of beads incubated in different Cu<sup>2+</sup> concentrations were evaluated

by image analysis using UltraQuant 6.0 software. The maximum OD of particular evaluated area was used; at least three parallel series and 2–3 areas of each sample were evaluated. To estimate calibration curve parameters, a computer-assisted non-linear



**Fig. 1.** Principle of the new Cu<sup>2+</sup> detection system using the AMP pathway. (A) Scheme of the AMP pathway, depicting synthesis intermediates, genes and their products. The enzymatic activities whose disruption leads to changes in cell coloring are marked by blue (“white” phenotype) and red (“red” phenotype). For a detailed description, see the results section. AIR, 5'-phosphoribosylaminoimidazole; CAIR, 5'-phosphoribosylaminoimidazole carboxylate; FAICAR, 5'-phosphoribosyl 4-carboxamide-5-formaminoimidazole; FGAM, 5'-phosphoribosyl-N-formylglycinamide; FGAR, 5'-phosphoribosyl-N-formylglycinamide; GAR, 5'-phosphoribosylglycinamide; IMP, inosine 5'-monophosphate; PRA, 5-phosphoribosylamine; PRPP, 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate; SAMP, adenylosuccinate; XMP, xanthosine 5'-monophosphate. (B) Predicted phenotypes of various yeast knockout strains under various growth conditions. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

regression analysis was used (using the GraphPAD software). The parameters were used to calculate  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations in unknown samples.

### 3. Results

#### 3.1. Construction of yeast strains able to change color depending on the level of extracellular copper

The AMP pathway of purine synthesis (Rebora et al., 2001) (Fig. 1A) was modified in *S. cerevisiae* BY4742 in two steps. In the first step, the gene *ADE2* (coding for AIR carboxylase) was deleted in the genome by the insertion of the kanMX cassette. In the resulting strain, BY-*ade2*, the AMP pathway is interrupted, leading to the accumulation of the Ade2p substrate AIR (P-ribosylaminoimidazole) (Fig. 1). Under conditions of oxidative metabolism, AIR is oxidized to a red pigment (Smirnov et al., 1967) that accumulates in cellular vacuoles (Weisman et al., 1987). Cells of the strain BY-*ade2* thus become red when growing under respiratory conditions in medium with limited adenine. With excess adenine, sufficient quantities of ADP and ATP are formed to inhibit Ade4p (first enzyme of AMP pathway) and thus also the rest of the AMP pathway. Consequently, AIR is not accumulated, and the cells remain white. In the second step, the BY-*ade2* strain was modified by introducing the promoter  $P_{\text{CUP1}}$  (*CUP1* promoter, inducible by  $\text{Cu}^{2+}$ ) in front of the gene *ADE5,7*, which encodes an enzyme that catalyzes the initial step(s) of AMP pathway (synthesis of GAR and AIR intermediates, Fig. 1A). In the absence of copper ions, *ADE5,7* is not expressed in BY-*ade2*- $P_{\text{CUP1}}$ -*ADE5,7*, and the cells behave like any *ade2Δ ade5,7Δ* strain, without forming the red pigment and remaining white (Fig. 1B). However the addition of  $\text{Cu}^{2+}$  to the medium should induce *ADE5,7* gene expression, Ade5,7p production and the formation of AIR, forming the red pigment (red cells under respiratory conditions). As shown in Fig. 2, according to this prediction, the strain BY-*ade2*- $P_{\text{CUP1}}$ -*ADE5,7* changes color from white to red upon the addition of  $\text{Cu}^{2+}$  and depending on the level of oxygen. This strain was therefore used as a “tester” strain in subsequent experiments.

#### 3.2. Detection of copper ions using the strain BY-*ade2*- $P_{\text{CUP1}}$ -*ADE5,7*

With the aim of optimizing the detection of copper ions using the tester strain BY-*ade2*- $P_{\text{CUP1}}$ -*ADE5,7*, various cultivation conditions were tested, including different media (YPD and SD with different supplements) and growth conditions (solid or liquid media). Both the tester strain and the parental control strain BY-*ade2* were used. In these experiments, we monitored the following: i) efficiency of red coloring of the BY-*ade2* cells independent of

the  $\text{Cu}^{2+}$  level, indicating the ability of the strain to accumulate oxidized AIR red pigment under particular conditions; ii) preservation of the white color of the tester strain when growing under conditions without  $\text{Cu}^{2+}$  (documenting that  $P_{\text{CUP1}}$  is not artificially induced) and iii) colorization of the tester strain after the addition of copper ions to the medium. In addition, we monitored possible differences in properties of the strains that could be caused by either an absence or an excess of  $\text{Cu}^{2+}$  as well as the stability of the cell coloring during prolonged incubation.

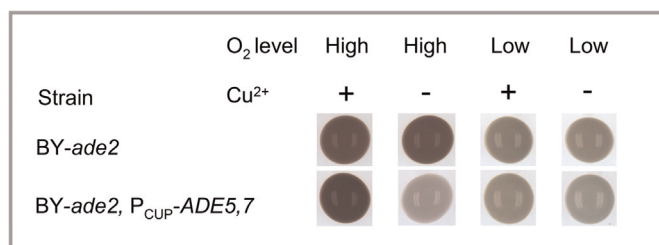
Comparing the YPD and SD media showed that SD medium is more suitable for  $\text{Cu}^{2+}$  detection. The complete YPD medium is less defined and usually contains traces of copper ions, which induce weak background expression from  $P_{\text{CUP1}}$  and thus interfere with the  $\text{Cu}^{2+}$  to be detected. In addition, the coloring of cells by the red pigment is partially obscured by the intrinsic color of the YPD medium. Therefore, we used SD medium for testing various concentrations of nutrient and adenine sulfate additives. Although differences in glucose concentration in the range of 2–8% in SD did not affect the red coloring of cells during 3 days of cultivation (data not shown), the level of adenine sulfate was crucial because both high and very low adenine sulfate levels decreased the efficiency of red coloring (Fig. S1A). The optimal medium for the visualization of red coloring of the BY-*ade2* strain was SD medium with 4 mg/L of adenine sulfate (SD-A4). Importantly, strain BY-*ade2*- $P_{\text{CUP1}}$ -*ADE5,7* develops only a very light pinkish color in this medium during 2 days of cultivation in the absence of  $\text{Cu}^{2+}$ . SD-A4 medium was then used for monitoring the effects of different  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations on the coloration of both strains.

Fig. S1B shows that differences in color of the BY-*ade2*- $P_{\text{CUP1}}$ -*ADE5,7* cultures after the addition of  $\text{Cu}^{2+}$  are clearly visible when the strain is cultivated with shaking in SD-A4 medium for 2 days. However, even under these optimized cultivation conditions, some inconsistencies in the detection persist. First, partial decolorization of the cell suspension of both the tester strain, BY-*ade2*- $P_{\text{CUP1}}$ -*ADE5,7*, and the control “red” strain, BY-*ade2*, occurs after prolonged cultivation times when using higher copper concentrations (50–100  $\mu\text{M}$ ) (Fig. S1B, blue arrows). Second, in the absence of copper ions or in the presence of very low concentrations of copper ions (0.16  $\mu\text{M}$ ), the speed of the red colorization is slow even in the control BY-*ade2* strain (Fig. S1B, red arrow), which decreases the range of the color difference compared with the BY-*ade2*- $P_{\text{CUP1}}$ -*ADE5,7* “tester” strain. Both of these problems were solved by the immobilization of the yeast strains in alginate beads (see below).

#### 3.3. Detection of copper ions using immobilized yeast strain

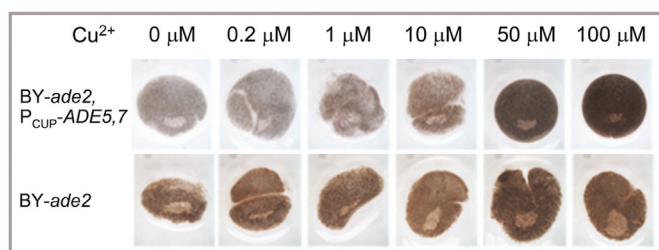
Cells of both the tester BY-*ade2*- $P_{\text{CUP1}}$ -*ADE5,7* and control BY-*ade2* strains were immobilized in alginate beads and pre-cultivated for 36 h in liquid YPAD medium with shaking. During this cultivation, the cells grown within the beads remained white because of the high concentration of adenine sulfate in YPAD medium. Pre-cultivation for 36 h was proved as the best; pre-cultivation shorter than 30 h resulted in less intense red coloring of the beads in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$ , pre-cultivation longer than 45 h caused slight red coloring of the beads without presence of any copper. The alginate beads filled with the grown yeast cell biomass were stored in distilled water at 4 °C and then used for copper ion detection. The beads with pregrown yeast can be stored for at least 50 days before the cells within the beads lose their ability to respond to the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  (see below).

The ability of immobilized BY-*ade2*- $P_{\text{CUP1}}$ -*ADE5,7* to detect copper ions was analyzed as follows: alginate beads with this strain pre-grown as described above were incubated with shaking in liquid SD medium without adenine but with various concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  (0–100  $\mu\text{M}$ ). Beads with the control strain BY-*ade2* were subjected



**Fig. 2.** Coloring of newly prepared strains under different cultivation conditions. Cells were grown for 2 days in liquid complete YPAD with shaking and then stored in distilled water at 4 °C. Then, they were cultivated 22 h in liquid minimal SD with 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  or without  $\text{Cu}^{2+}$  in combination with normoxic or hypoxic conditions. After cultivation, the cells were collected by centrifugation, and drops (30  $\mu\text{L}$ ) of the cell suspension were photographed. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)





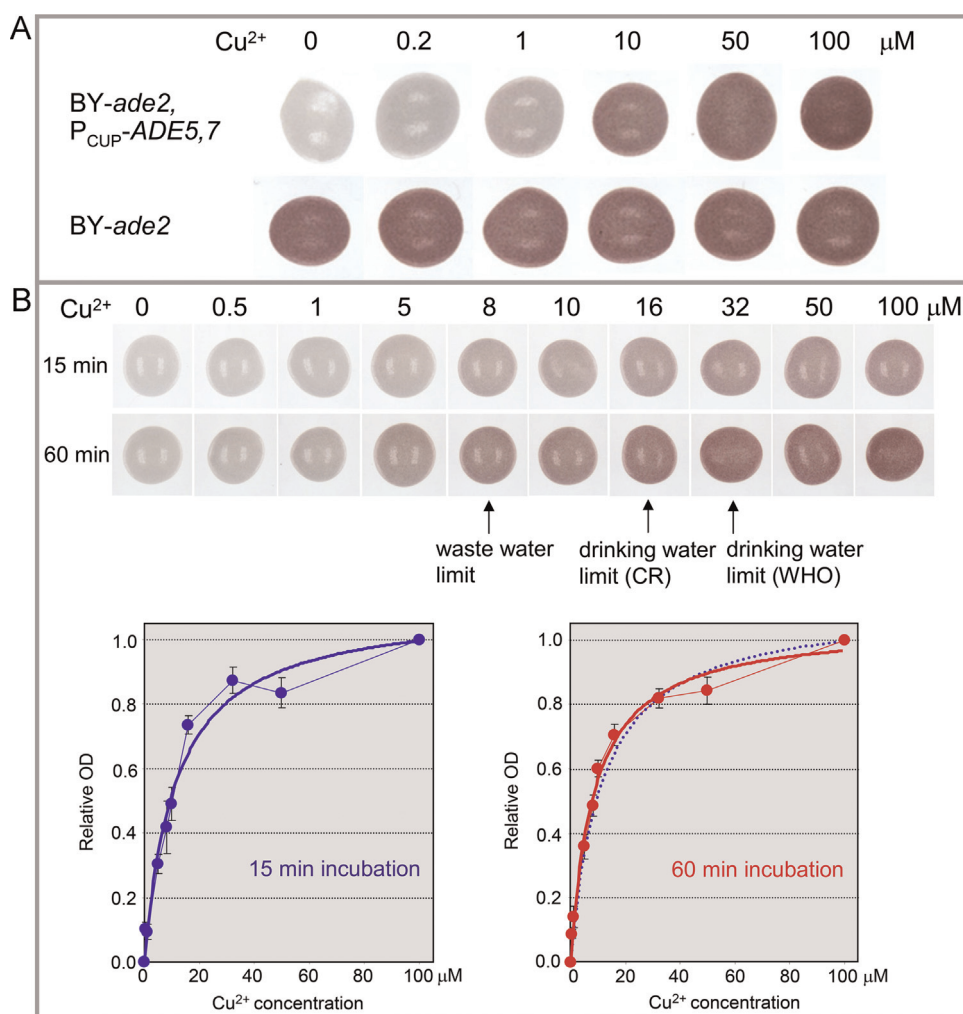
**Fig. 3.** Effect of  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations on coloring of cells within alginate beads. Cells of both strains were immobilized in sodium alginate. After pre-cultivation in YPAD, alginate beads were cultivated for 18 h with shaking in liquid SD without adenine sulfate and supplemented with  $\text{Cu}^{2+}$  at various concentrations. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

to the same treatment in parallel. The biomass of cells of both strains in the beads remains constant because the cells cannot grow and divide when incubated in SD medium without adenine. This arrangement prevents the release of cells from the alginate beads during the incubation. The intensity of the red coloring of the beads

was evaluated after 18 h of incubation (Fig. 3). Whereas the intensity of red color of the  $\text{BY-ade2-P}_{\text{CUP-ADE5,7}}$  beads corresponded to the concentration of copper in the incubation medium, the red color of beads with the  $\text{BY-ade2}$  strain was approximately the same in every medium tested, independent of the  $\text{Cu}^{2+}$  concentration. Thus, as shown in Fig. 3, using cells pre-grown in alginate beads with an excess of adenine followed by incubation in SD medium without adenine eliminated both the slow colorization at low concentrations and the de-colorization in higher  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations observed in liquid cultures of non-immobilized cells. In other words, alginate beads allowed the separation of cell growth from the detection of copper.

### 3.4. Induction of coloring of immobilized yeast strains using increased oxygen levels

As mentioned above, the coloration of  $\text{ade2}\Delta$  cells is caused by oxidation of the intermediate AIR to red pigment (Smirnov et al., 1967). Therefore, the alginate beads with pre-grown yeast cells were incubated in medium with or without copper ions with



**Fig. 4.** Sensitivity of the new alginate-bead  $\text{Cu}^{2+}$  detection system (optimized protocol). (A) Comparison of the coloring of the control strain  $\text{BY-ade2}$  and the tester strain  $\text{BY-ade2-P}_{\text{CUP-ADE5,7}}$  in various  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations (0–100  $\mu\text{M}$ ). After pre-cultivation in YPAD, alginate beads were cultivated for 20 h without shaking in liquid SD without adenine sulfate and then incubated for 1 h while being exposed to air. (B) Calibration curves showing sensitivity of the alginate beads with  $\text{BY-ade2-P}_{\text{CUP-ADE5,7}}$  after 15 and 60 min of incubation in air. Alginate beads were incubated for 17 h without shaking in liquid SD medium without adenine sulfate.  $\text{Cu}^{2+}$  concentration limits in wastewater (0.5 mg  $\text{Cu}^{2+}/\text{L} = 7.87 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ) and drinking water are indicated by arrows. CR, limit in Czech Republic (1 mg  $\text{Cu}^{2+}/\text{L} = 15.74 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ), WHO, limit recommended by the WHO (2 mg  $\text{Cu}^{2+}/\text{L} = 31.47 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ). Bottom panels: calibration curves determined by the image analysis. Individual average values of experimental data (circles) with SEM bars and curves (thick lines) obtained by non-linear regression analysis of the experimental data are shown for both 15 min (blue) and 60 min (red) incubation of alginate beads on air. Dotted blue line in the right panel shows non-linear regression curve for 15 min incubation. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

shaking. This incubation, however, sometimes resulted in the rupture of alginate beads (Fig. 3). The efficiency of coloring could also be affected by the intensity of the shaking, which can affect  $O_2$  availability for AIR oxidation. We therefore further modified the procedure to optimize the detection of  $Cu^{2+}$ .

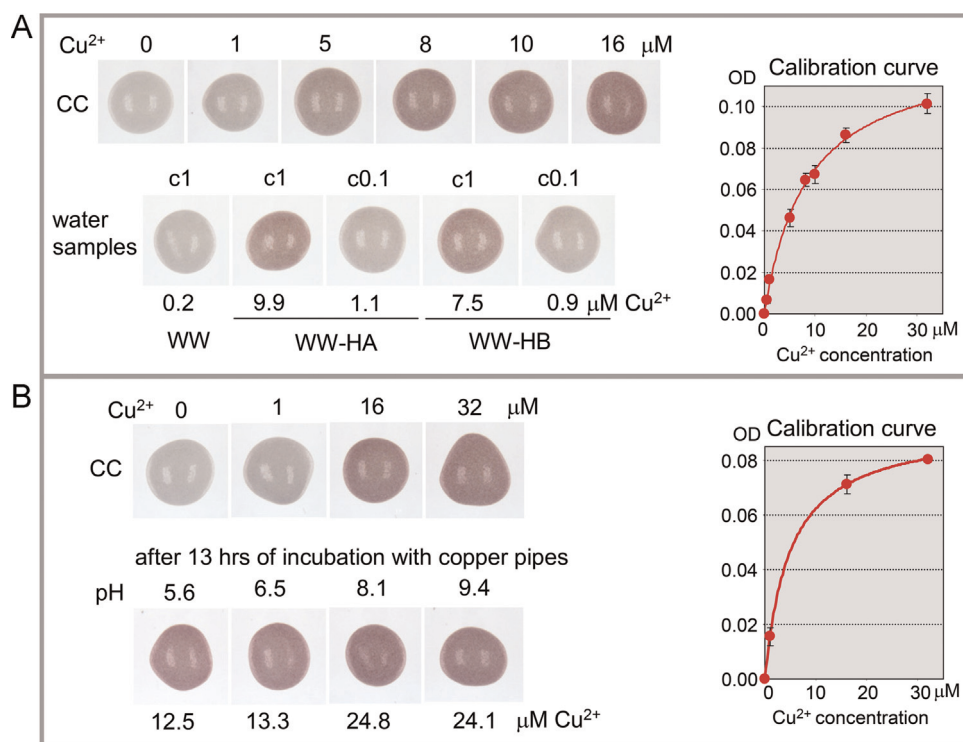
The beads with immobilized cells pre-grown in YPAD medium were incubated statically (in an incubator) in SD without adenine and with various copper concentrations. Because of the low oxygen accessibility, the cells within the beads of both tester and control strains remained white even after 19 h of incubation, independent of the copper concentration. However, when the beads of either BY-ade2- $P_{CUP}$ -ADE5,7 or BY-ade2 were taken from the medium and exposed to  $O_2$ , e.g., by deposition on a glass slide (transfer to conditions with sufficient oxygen diffusion from the air), the beads with cells producing AIR began to change color within a few minutes (Fig. 4), becoming first pink and then red. After 10–20 min of incubation on the glass slide, BY-ade2- $P_{CUP}$ -ADE5,7 beads were colored according to the concentration of copper ions (1–100  $\mu M$ ) present in the original incubation medium. After 1 h of incubation, the differences were even more prominent (Fig. 4B). The intensity of the coloring of the beads was quantified by image analysis. To be able to compare parallel independent calibration series, the value obtained with 100  $\mu M$   $Cu^{2+}$  was set as 1. The results obtained after 1 h incubation of the beads on air provided better calibration data and  $Cu^{2+}$  determination was thus more precise as shown in Fig. 4B. The profiles of the calibration curves obtained by non-linear regression, however, did not significantly differ when comparing 15 min and 1 h incubation times. The calibration curves were similar regardless of the age of the beads, if the beads were stored from 2 to 53 days at 4 °C before they were used for the calibration test (Fig. S2). The range of the detection (calibration curves) was reproducible with beads of different batches when using standard pre-cultivation of

the beads for 36 h, followed by 17–24 h of cultivation with copper and 1 h exposition on air. Concentrations higher than 100  $\mu M$   $Cu^{2+}$  caused only slight increase of the bead coloring (because the saturation of the color is almost reached), but only concentrations above 2000  $\mu M$   $Cu^{2+}$  started to inhibit the red coloring of the beads, because of copper toxicity to cells. As predicted, all beads with the BY-ade2 strain turned red independent of the copper ion concentration. In contrast to shaken cultivation, the beads were not disrupted, and their coloring was faster and more efficient.

### 3.5. Detection of copper ions in samples of water from different sources

To evaluate our new  $Cu^{2+}$  detection system in practice, we analyzed well water from a village near Prague (sample WW) as well as the same water after heating in water heaters with copper coils (boiler) by two village residents (samples WW-HA and WW-HB) (Fig. 5). As shown in Fig. 5A, low concentration of copper ions ( $\sim 0.2$   $\mu M$ ) was determined in the water from the well using calibration curves (no difference between this sample and the negative control was visible by naked eye), whereas significant amounts of  $Cu^{2+}$  (7–10  $\mu M$   $Cu^{2+}$  according to the calibration scale) appeared in the same water after heating with copper coil (boiler). Analysis of the same water samples by the VIS laboratory, accredited by CAI (Water Engineering Services, Inc.), confirmed the absence of  $Cu^{2+}$  in the well water ( $WW < 0.079$   $\mu M$   $Cu^{2+}$ ) and the presence of  $Cu^{2+}$  in the heated samples (WW-HA = 15.1  $\mu M$   $Cu^{2+}$ ; WW-HB = 17.31  $\mu M$   $Cu^{2+}$ ). The slightly higher amount of  $Cu^{2+}$  detected by the VIS laboratory is likely caused by the fact that some of the  $Cu^{2+}$  in the water occurs as tiny insoluble particles (visible to eye).

A second test was performed with new copper pipes that we



**Fig. 5.**  $Cu^{2+}$  detection in real water samples. (A)  $Cu^{2+}$  detection in samples of well water from a village near Prague before (WW) and after heating with a copper coil (in boilers) (WW-HA and WW-HB). A calibration curve of beads treated in 0–16  $\mu M$   $Cu^{2+}$  is shown (CC). Both sample and calibration beads were incubated for 1 h exposed to air after 17 h of static growth. Undiluted (c1) and 10x diluted (c0.1) samples were used. Right, a calibration curve determined by image analysis; bars, SEM. Parameters of the curve determined by Graph Pad software were used to estimate  $Cu^{2+}$  concentration of water samples (values specified below the particular bead). (B)  $Cu^{2+}$  detection in 10.5 mM KCl, with pH values as indicated, in which new copper pipe was incubated for 13 h. A calibration curve of beads treated in 0–32  $\mu M$   $Cu^{2+}$  is shown (CC). Both sample and calibration beads were incubated for 30 min with exposure to air after 23 h of static growth. Right, a calibration curve determined by image analysis; bars, SEM. Parameters of the curve determined by Graph Pad software were used to estimate  $Cu^{2+}$  concentration of water samples (values specified below the particular bead).

incubated in 10.5 mM KCl for 13 h. Because it has been reported (WHO, 2008) that  $\text{Cu}^{2+}$  release is more efficient at lower pH, we varied the pH of the 10.5 mM KCl in the range from 5.6 to 9.4. As shown in Fig. 5B, after 13 h,  $\text{Cu}^{2+}$  was released from the pipes at a concentration that at least in two samples exceeded the drinking water limit ( $16 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ), but we did not observe the reported pH effect. The efficiency of  $\text{Cu}^{2+}$  release thus could differ according to the quality of particular pipe fittings.  $\text{Cu}^{2+}$  in concentrations higher than  $16 \mu\text{M}$  was also released in distilled water without KCl (not shown).

#### 4. Discussion

Contamination of water by heavy metals coming from various industrial sources represents a serious problem for the health of both aquatic and terrestrial organisms, including human. Most of the heavy metals are toxic even in relatively low concentrations, and they cannot be naturally removed from the environment. Preventing the release of heavy metals to the environment requires the efficient detection of their presence in water produced as industrial waste.

Here, we present a new, simple and efficient system allowing the detection of copper ions in water with high sensitivity. The system is based on a strain of the yeast *S. cerevisiae* with modifications to two steps of the purine biosynthesis pathway (tester strain). Cells of this strain increase the intensity of red color produced proportionally to the concentration of copper ions in incubation medium, allowing the detection of copper ions in the range of 1–100  $\mu\text{M}$ . The system was optimized for the use of tester strain cells immobilized in alginate beads and static incubation in the presence of various copper ion concentrations under conditions of low aeration. The final coloration of the beads develops quickly (in 30–60 min) after the beads are exposed to aerial oxygen. This optimized protocol has numerous advantages over both non-immobilized cells and the beads with immobilized cells incubated with shaking. First, the biomass of cells in the beads is sufficiently high before the copper detection step, which avoids the negative effects of high or low copper ion concentrations on cell growth, as observed for free cells in liquid cultures. Moreover, the high cell density within the beads results in much more intense and thus more easily detectable coloration than the coloration observed in sparse cell populations in liquid cultivation. The use of immobilized sensors thus leads to more precise readings. Second, because the cells within the beads do not need to grow but only to synthesize specific enzymes (produced through the induction of the CUP promoter) and to accumulate the intermediate AIR, the detection of copper by immobilized sensors is quicker than in growing liquid cultures. Third, because the cells within the beads do not increase their biomass, they neither damage the beads nor leak out of the beads. Finally, static incubation of the beads with copper ions under hypoxic conditions allows sufficient accumulation of the intermediate AIR, which is subsequently quickly oxidized once the beads are exposed to the air. This allows better calibration of the system and detection of various copper ion concentrations. Static cultivation also helps to maintain the structure of the beads.

The system presented here takes advantage of a very easy detection that is readable by the naked eye with no need of either specialized equipment such as in the case of detection based on changes in the fluorescence intensity of GFP or other fluorescent protein(s) (Shetty et al., 2004), or changes in the amount of  $\beta$ -galactosidase, which is detected by changes in  $\text{O}_2$  consumption by cells in the biosensor (Lehmann et al., 2000), or by a relatively laborious method using biosensor cells on filters and X-gal, a substrate of  $\beta$ -galactosidase (Freire-Picos and Lamas-Maceiras,

2006). In addition, all three cited systems are based on a gene or genes expressed from plasmids, which risks plasmid loss or changes in plasmid copy number (both affecting the measured data) during biosensor growth and the necessity of using antibiotics for selection pressure when preparing biosensor cells. Our detection system, however, is based on a stable biosensor strain with genetic modifications in its chromosomes. Our biosensor also allows rough  $\text{Cu}^{2+}$  quantification if the detection is performed in parallel with a calibration of coloring intensity using samples of known  $\text{Cu}^{2+}$  concentration. Either direct visual reading or more precise image analysis can be used for construction of the calibration curves. Additional detection controls can help to exclude false-negative readings. For example, toxic compounds in wastewater could decrease viability of the biosensor. Addition of known  $\text{Cu}^{2+}$  concentration to wastewater samples is therefore suitable control to prove biosensor functionality. The insufficient coloring of such control sample indicates presence of toxic compound(s) and necessity of lowering of the toxicity by the sample dilution. Testing of real samples of drinking or service water proved that the new biosensor system is valuable in practical usage. It can, for example, show the release of copper ions from copper plumbing including quantification of the amount of copper ions in washing water. The reported biosensor can also be easily modified for the detection of other chemical substances by replacing the CUP1 promoter with another promoter that is induced specifically by the particular substance.

New biosensor enables detection of copper ion concentration as low as  $60 \mu\text{g/L}$  ( $1 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ), approximately. Such sensitivity is comparable with the best colorimetric detection systems that usually range from 0.1–1 mg of  $\text{Cu}^{2+}/\text{L}$  (Abe et al., 1989; Rizk et al., 1992), but it is, of course, lower than highly sensitive FAAS requiring special expensive instrumentation (FAAS detection limit is  $0.5 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ ; (Pourreza and Hoveizavi, 2005)). The new biosensor is based on baker yeast *S. cerevisiae* modified in their AMP metabolic pathway and the detection assay does not require any hazardous/toxic compound(s) like in some other colorimetric assays that reach similar or even slightly higher sensitivity. For example, probably the most sensitive colorimetric assay with detection limit of  $20 \mu\text{g}$  of  $\text{Cu}^{2+}/\text{L}$  uses toxic resorcinol (Mir, 2011). Similarly, chelating agent diethyldithiocarbamate (DDTC) forms a complex with  $\text{Cu}^{2+}$  that is insoluble in water and has to be extracted to toxic organic solvents (such as carbon tetrachloride or chloroform) for  $\text{Cu}^{2+}$  detection using DDTC and ultraviolet-visible spectrophotometry (Uddin et al., 2013). Pre-cultivated beads of the new biosensor can be stored ready to use with reproducible results for at least 50 days and the detection requires overnight incubation of the beads in tested water samples. Commercial Copper test strips EM Quant<sup>®</sup> ([www.galladechem.com](http://www.galladechem.com)) allow to detect  $\text{Cu}^{2+}$  more quickly (in 1–10 min), however, they are designed to detect only relatively high copper concentrations (10–300 mg/L). The new biosensor uses CUP1 promoter specifically responding to  $\text{Cu}^{2+}$  without cross-reacting with other metal cations (such as  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$ ) with exception of silver (Dameron et al., 1991; Shetty et al., 2004; and data not shown).

#### 5. Conclusions

This study presents new biosensor allowing the detection of copper ions in the range of 1–100  $\mu\text{M}$ . The biosensor thus fully covers the copper concentrations accepted as the limit of copper ions in waste water ( $7.87 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ) and drinking water ( $15.74 \mu\text{M Cu}^{2+}$  in Czech Republic and  $31.47 \mu\text{M Cu}^{2+}$  according to WHO). The biosensor is based on *S. cerevisiae* cells immobilized in alginate beads and genetically modified in their genome (i.e., with no risk of bias caused by gene copy number changes, as in biosensors

based on plasmids) in a way leading to production of red pigment upon presence of extracellular copper ions. The biosensor takes advantage of an easy detection and rough quantification of copper concentration in many parallel samples of water that is readable by the naked eye with no need of any specialized equipment. The naked eye readings are confirmed by color intensity quantification using image analysis. The biosensor beads ready for use can be stored at least 50 days before the cells lose their ability to respond to the presence of copper. The biosensor was successfully used for the determination of copper concentrations in real samples of water contaminated with copper ions.

## Acknowledgments

This study was supported by the Technology Agency of the Czech Republic TA01011461, Charles University in Prague (UNCE 204013 and SVV-2015-260209), RVO 61388971 and by the project 'BIOCEV – Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of Sciences and Charles University' (CZ.1.05/1.1.00/02.0109) from the European Regional Development Fund and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic project CZ.1.07/2.3.00/30.0003. The authors declare no conflict of interest.

## Appendix A. Supplementary information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.bios.2015.05.006](https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.006).

## References

- Abe, A., Yamashita, S., Noma, A., 1989. Sensitive, direct colorimetric assay for copper in serum. *Clin. Chem.* 35 (4), 552–554.
- Alpat, S.K., Alpat, S., Kutlu, B., Ozbayrak, O., Buyukisik, H.B., 2007. Development of biosorption-based algal biosensor for Cu(II) using *Tetraselmis chuii*. *Sens. Actuators B* 128 (1), 273–278.
- Belkin, S., 2003. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Curr. Opin. Microbiol.* 6 (3), 206–212.
- Corbisier, P., Lelie, D., Borremans, B., Provoost, A., Lorenzo, V., Brown, N.L., Lloyd, J.R., Hobman, J.L., Csoregi, E., Johansson, G., Mattiasson, B., 1999. Whole cell-and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples. *Anal. Chim. Acta* 387, 235–244.
- Dameron, C.T., Winge, D.R., George, G.N., Sansone, M., Hu, S., Hamer, D., 1991. A copper thiolate polynuclear cluster in the Ace1 transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (14), 6127–6131.
- Freire-Picos, M.A., Lamas-Maceiras, M., 2006. KIHIS4-modulated histidine auxotrophy in yeast and characterisation of a KIHIS4-lacZ-based cadmium and copper biosensor. *Enzym. Microb. Technol.* 40 (1), 67–70.
- Gietz, R.D., Woods, R.A., 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Method Enzymol.* 350, 87–96.
- Lee, S., Sode, K., Nakanishi, K., Marty, J.L., Tamiya, E., Karube, I., 1992. A novel microbial sensor using luminous bacteria. *Biosens. Bioelectron.* 7 (4), 273–277.
- Lehmann, M., Riedel, K., Adler, K., Kunze, G., 2000. Amperometric measurement of copper ions with a deputy substrate using a novel *Saccharomyces cerevisiae* sensor. *Biosens. Bioelectron.* 15 (3–4), 211–219.
- Leth, S., Maltoni, S., Simkus, R., Mattiasson, B., Corbisier, P., Klimant, I., Wolfbeis, O. S., Csoregi, E., 2002. Engineered bacteria based biosensors for monitoring bioavailable heavy metals. *Electroanalysis* 14 (1), 35–42.
- Mir, S.A., 2011. Resorcinol method for colorimetric microdetermination of copper in pure forms. *Int. J. ChemTech Res.* 3 (2), 661–670.
- Pourreza, N., Hoveizavi, R., 2005. Simultaneous preconcentration of Cu, Fe and Pb as methylthymol blue complexes on naphthalene adsorbent and flame atomic absorption determination. *Anal. Chim. Acta* 549 (1–2), 124–128.
- Rebora, K., Desmoucelles, C., Borne, F., Pinson, B., Daignan-Fornier, B., 2001. Yeast AMP pathway genes respond to adenine through regulated synthesis of a metabolic intermediate. *Mol. Cell. Biol.* 21 (23), 7901–7912.
- Rizk, M., Zakhari, N.A., Toubar, S.S., el-Shabrawy, Y., 1992. Sensitive colorimetric determination of copper (II) ions in some chemicals and multivitamins. *Acta Pharm. Hung.* 62 (4), 158–166.
- Shetty, R.S., Deo, S.K., Liu, Y., Daunert, S., 2004. Fluorescence-based sensing system for copper using genetically engineered living yeast cells. *Biotechnol. Bioeng.* 88 (5), 664–670.
- Smirnov, M.N., Smirnov, V.N., Budowsky, E.I., Inge-Vechtomov, S.G., Serebrjakov, N. G., 1967. Red pigment of adenine-deficient yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27 (3), 299–304.
- Su, L.A., Jia, W.Z., Hou, C.J., Lei, Y., 2011. Microbial biosensors: a review. *Biosens. Bioelectron.* 26 (5), 1788–1799.
- Tekaya, N., Saiapina, O., Ben Ouada, H., Lagarde, F., Ben Ouada, H., Jaffrezic-Renault, N., 2013. Ultra-sensitive conductometric detection of heavy metals based on inhibition of alkaline phosphatase activity from *Arthrospira platensis*. *Bioelectrochemistry* 90, 24–29.
- Uddin, M.N., Salam, M.A., Hossain, M.A., 2013. Spectrophotometric measurement of Cu(DDTC)(2) for the simultaneous determination of zinc and copper. *Chemosphere* 90 (2), 366–373.
- Vopalenska, I., Vachova, L., Palkova, Z., 2014. Zpusob modifikace detekcniho kvassinkoveho kmene. Patent application PV 2014-269.
- Weisman, L.S., Bacallao, R., Wickner, W., 1987. Multiple methods of visualizing the yeast vacuole permit evaluation of its morphology and inheritance during the cell cycle. *J. Cell Biol.* 105 (4), 1539–1547.
- WHO, 2008. Guidelines for Drinking-Water Quality (Recommendations). vol 1. World Health Organization, Geneva.
- Yuce, M., Nazir, H., Donmez, G., 2010. A voltammetric *Rhodotorula mucilaginosa* modified microbial biosensor for Cu(II) determination. *Bioelectrochemistry* 79 (1), 66–70.
- Zhu, Y.B., Inagaki, K., Chiba, K., 2009. Determination of Fe, Cu, Ni, and Zn in seawater by ID-ICP-MS after preconcentration using a syringe-driven chelating column. *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (9), 1179–1183.